



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

**LAS PROTEINAS DEL GEN P/V/C DEL VIRUS DE SARAMPIÓN
INTERFIEREN CON LA RESPUESTA INMUNE INNATA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA: MIGUEL LEONARDO GARCÍA LEÓN

MIEMBROS DEL COMITE TUTORAL:

Dr. José Ignacio Santos Preciado, Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, Facultad de Medicina, UAEM
Dr. Rafael Saavedra Duran, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D. F. Septiembre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

TUTORES:

Dr. José Ignacio Santos Preciado, por la oportunidad de trabajar en el laboratorio.

Dr. en C. Fernando Esquivel Guadarrama, por su paciencia, disposición y sobre todo por sus valiosas aportaciones al correcto desarrollo de esta tesis.

ASESORES:

Dra. en C. Rosa María Wong Chew por sus consejos y apoyo incondicional.

Dr. en C. Greco Hernández Ramírez por su amistad, apoyo y asesoría para el mejoramiento de esta tesis.

FINANCIERO:

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 165414 otorgada para la realización de esta tesis.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Consejo de Ciencia y Tecnología proyecto CONACyT Salud 2007-CO1-69852.

ASESORIA TECNICA:

Dra. en C. Miriam Enriqueta Nieves Ramírez, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, por su asesoría y apoyo en la realización de los ensayos de RT²-PCR tiempo real.

QFB. María José Gómora Herrera, Torre de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM, por su asesoría en la obtención de las imágenes en el microscopio confocal.

ÍNDICE

	Páginas
1. Abreviaturas	6
2. Resumen	7
3. Abstract	8
4. Virus de Sarampión	
4.1 Generalidades	9
4.2 Clasificación	9
4.3 Morfología	9
4.4 Genoma	10
4.5 Proteínas	11
4.5.1 Proteína L (Larga)	12
4.5.2 Proteína N (Nucleocápside)	12
4.5.3 Proteína H (Hemaglutinina)	13
4.5.4 Proteína F (Fusión)	15
4.5.5 Proteína M (Matriz)	17
4.5.6 Proteína P (Fosfoproteína)	17
4.5.7 Proteína V	18
4.5.8 Proteína C	19
5. Epidemiología	20
6. Cuadro Clínico	23
7. Patogénesis	25
8. Respuesta inmune al Virus de Sarampión	
8.1 Respuesta inmune innata	28
8.2 Respuesta inmune adaptativa	35
9. Vacunas	37
10. Regulación de las vías de señalización y Producción del interferón de la proteína C	40
11. Planteamiento del problema	45
12. Pregunta de Investigación	45
13. Justificación	45
14. Hipótesis	46
15. Objetivos	
15.1 Objetivo General	46
15.2 Objetivos Particulares	46
16. Estrategia Experimental	47

17. Materiales y Métodos	48
17.1 Líneas celulares	48
17.2 Virus y título viral	48
17.3 Material Genómico y vectores de expresión	49
17.4 Secuencia de proteínas V y C del virus de sarampión	50
17.5 Vectores de expresión	51
17.6 Mutagénesis Sitio Dirigida	52
17.7 Células establemente transfectadas	53
17.8 Ensayos Duales de Luciferasa	53
17.9 Ensayos de Western Blot	54
17.10 Microscopía Confocal	56
17.11 RT ² -PCR de citocinas	56
18. Análisis Estadístico	57
19. Resultados	58
19.1 Mutaciones presentes en el gen V y C del Virus de Sarampión	58
19.2 Localización sub-celular de la proteína C	59
19.3 Localización de la proteína C dependiente de la secuencia de localización nuclear	63
19.4 La proteína C del virus silvestre H1 inhibe la inducción del promotor de interferón	65
19.5 La proteína C del virus silvestre H1 inhibe específicamente la inducción del interferón pero no de otras citocinas	67
20. Discusión	70
21. Conclusiones	77
22. Bibliografía	78

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Micrografía y diagrama de la estructura del VS
Figura 2	Diagrama del Genoma del VS
Figura 3	Morbilidad por el VS en México
Figura 4	Receptores para el VS
Figura 5	Vías de señalización para la producción de IFN-I y citocinas proinflamatorias inducidas por el VS
Figura 6	Cepas Vacunales
Figura 7	Rutas de inhibición del IFN-I por las proteínas no estructurales del VS
Figura 8	Esquema de los vectores pJET1.2/blunt y pcDNA3.1/V5-His-TOPO
Figura 9	Ensayos de PCR, Western Blot con las construcciones de la proteína C del VS completa y deletada de la NLS
Figura 10	Acumulación nuclear de la proteína C _{WT} -V5 a partir de cDNA transfectado en células HEK293
Figura 11	Localización subcelular de la proteína C del virus EZ y silvestre de sarampión con una mutación presente en la secuencia de localización nuclear (NLS)
Figura 12	Estandarización del inductor de IFN para los ensayos de luciferasa
Figura 13	Inhibición de la actividad del IFN- β por la proteína C del Virus de Sarampión
Figura 14	Ensayos de RT-PCR en tiempo real
Tabla 1	Análisis de la función de los efectos funcionales de la proteína C del VS
Tabla 2	Comparación de la secuencia de aminoácidos de V y C de los virus de sarampión Edmonston-Zagreb y Silvestre H1

1. Abreviaturas

aa.- aminoácidos

ARN.- Ácido Ribonucléico

C.- Proteína C.

CD46.- Proteína de cofactor de membrana

CD150 o SLAM.- Señal Linfocitaria de Activación Molecular

F.- Fusión.

H.- Hemaglutinina

HSP72.- Proteína de shock térmico 72

IFN-1.- Interferón tipo I

IRF3/7.- Factor regulador de interferón 3 ó 7

L.- Proteína Larga

M.- Matriz

N.- Nucleocapside.

NCT.- Nucleótidos.

Nectina 4 o PVRL4.- Proteína tipo receptor de poliovirus

NES.- Secuencia de exportación a núcleo

NLS.- Secuencias de localización a núcleo

P.- Fosfoproteína

RNP.- Complejo Ribonucleoproteico.

V.- Proteína V.

VS.- Virus de sarampión.

2. Resumen

Antecedentes: El sarampión es una enfermedad infecciosa causada por el virus de sarampión (VS), es responsable de 158,000 muertes anuales alrededor del mundo. El VS causa una inmunosupresión transitoria que puede durar meses y debido a ello se incrementa la morbi-mortalidad principalmente por infecciones secundarias. El VS pertenece al género *Morbilivirus* de la familia *Paramixoviridae*, es un virus envuelto de ARN de cadena sencilla no segmentada de sentido negativo. Su genoma codifica para seis proteínas estructurales: Nucleocápside (N), Fosfoproteína (P), Proteína larga (L), Hemaglutinina (H), Fusión (F) y de Matriz (M). El gen P codifica para dos proteínas adicionales no estructurales, V y C. Estas proteínas juegan un papel muy importante en la infección por el VS, ya que regulan la producción de interferón tipo I (IFN-I). Estas citocinas se producen importantemente en células infectadas por virus; sirven como una respuesta temprana para inhibir la replicación viral, previene la infección de células vecinas y forman un puente muy importante entre la respuesta innata y adaptativa. Se ha descrito que la proteína C es importante en el ensamblaje viral, regula la vía de señalización del receptor de IFN-I, modula los niveles del mRNA viral, posee la capacidad de entrar y salir del núcleo celular debido a que porta secuencias de localización y exportación. Es probable entonces que la proteína C sea capaz de regular la producción de IFN-I desde ese sitio.

Objetivo: Evaluar el papel de la proteína C de los virus Edmonston-Zagreb y Silvestre de sarampión en la regulación de la respuesta inmune innata.

Material y Métodos: En este trabajo se emplearon dos líneas celulares (HEK293, A549), los virus de sarampión Silvestre-H1 y Vacunal-Edmonston-Zagreb. Se obtuvieron y compararon las secuencias de las proteínas V/C de ambos virus, clonadas en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. El análisis de expresión se realizó mediante ensayos de Microscopía Confocal y Western Blot. La regulación del IFN β se realizó mediante ensayos de detección por el método de Luciferasa y RT-PCR empleando los plásmidos: p125-Luc/pRen, C_{EZ}, C_{WT}, C_{EZ}/ Δ NLS, C_{WT}/ Δ NLS, y V_{WT}.

Resultados: La secuencia de aminoácidos de las proteínas V y C del virus vacunal y silvestre de sarampión mostraron 26 y 9 cambios respectivamente, comparadas con el genoma del virus de Sarampión (GenBank/AF266290.2), algunos de estos cambios ya habían sido previamente reportados. Los resultados de la expresión sub-celular a las 24 hrs mostraron la expresión de la proteína C_{EZ}, en el citoplasma y núcleo celular a diferencia de la proteína C_{WT} que se observó exclusivamente en el núcleo. En este sentido la proteína C_{WT} posee una mayor capacidad que la proteína C_{EZ} en la inhibición específica del promotor de IFN β y no así de otras citocinas (IL-6 e IL-10). Esta regulación es dependiente de la secuencia de localización nuclear (NLS), ya que al utilizar mutantes de la proteína C (Δ NLS), esta pierde su capacidad de regular al IFN β , lo que demuestra que la NLS es crítica para permitir el acceso de la proteína C al núcleo celular.

Conclusiones: Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la localización sub-celular de la proteína C_{WT} difiere de la C_{EZ}, y la localización nuclear de la proteína C del VS es dependiente de la NLS. Además, debido a su presencia en el núcleo celular, la proteína C_{WT} inhibe específicamente la inducción del promotor de IFN β y no otras citocinas.

3. Abstract

Background: Measles is an infectious disease caused by measles virus (MeV), it is responsible for 158,000 deaths annually worldwide. The MeV causes a transient immunosuppression, which can last months. It is known that the major cause of morbi-mortality from measles is due to secondary infections associated with this immunosuppression. MeV belongs to the *Morbillivirus* genus in the *Paramyxoviridae* family, is an enveloped non-segmented and negative-sense single-stranded RNA virus. It's genome encodes six structural proteins: Nucleocapsid (N), Phosphoprotein (P), Long protein (L), Hemagglutinin (H), Fusion (F) and Matrix (M). The P gene encodes two additional non-structural proteins, C and V. These proteins play an important role in MeV infection, regulating Type I interferon (IFN-I) production. These cytokines are produced importantly in virus-infected cells; they serve as an early response to inhibit viral replication, prevent infection of neighboring cells and form a very important bridge between innate and adaptive immune response. The C protein is important in viral assembly, it regulates type I interferon signaling pathway, modulates viral mRNA levels and possess the ability to move between the cell nucleus and cytoplasm, because it carries nuclear localization and exportation sequences. Since it has the ability to enter the nucleus, it is likely that C protein is capable of regulating IFN-I production from that site.

Objective: To evaluate the role of the C protein from the Edmonston-Zagreb and wild-type measles virus strains in the regulation of the innate immune response.

Material and Methods: For this study, two cell lines (HEK293, A549) and two MeV strains Wild type-H1 and Vaccine-Edmonston-Zagreb were used. We obtained and compared the sequences of the V/C protein of both viruses cloned in the pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector. Expression analysis was performed by Confocal Microscopy and Western Blot assays. IFN β regulation was performed by Luciferase and RT-PCR assays, using plasmids: p125-Luc /pRen, C_{EZ}, C_{WT}, C_{EZ}/ Δ NLS, C_{WT}/ Δ NLS and V_{WT}.

Results: The amino acid sequence of V and C proteins from the vaccine and wild type measles virus showed 26 and 9 changes respectively. We compared these sequences with a Measles virus genome (GenBank/AF266290.2), some of these changes had previously been reported. The results of the sub-cellular expression at 24 hrs showed expression of C_{EZ} protein in the cytoplasm and nucleus, compared to C_{WT} protein, which was observed exclusively in the nucleus. In this sense, the C_{WT} protein has a greater capacity than the C_{EZ} protein to specifically inhibit IFN β promoter and not other cytokines (IL-6 and IL-10). This regulation is dependent on the nuclear localization sequence (NLS), because the ability to regulate IFN β is lost when using the mutant C protein (Δ NLS) , demonstrating that the NLS is critical for the access of the C protein to the cell nucleus.

Conclusions: The results of this work show that the sub-cellular localization of the protein differs from C_{WT} compared to C_{EZ}, and the nuclear localization of the C protein of MeV is dependent on the NLS. Also, because of its presence in the cell nucleus, C_{WT} protein specifically inhibits IFN β promoter induction and not other cytokines.

4. Virus de Sarampión

4.1 Generalidades

El virus de Sarampión (VS) es un virus envuelto, su genoma está conformado por una cadena sencilla de ARN no segmentado, pertenece al género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Basados en el análisis de secuencia de la región carboxilo terminal del gen N, hasta el momento se han definido 8 tipos diferentes con al menos 22 genotipos(1). A pesar de la existencia y viabilidad de una vacuna de virus vivos atenuados, el sarampión continua siendo una de las mayores causas de muerte en niños en países en desarrollo (2). Debido principalmente a que causa una severa inmunosupresión transitoria y facilita las infecciones secundarias (3-5).

4.2 Clasificación

Orden	<i>Mononegavirales</i>
Familia	<i>Paramyxoviridae</i>
Subfamilia	<i>Paramyxoviridae</i>
Genero	<i>Morbillivirus</i>
Especie	<i>Virus de Sarampión</i>

4.3 Morfología

El virión del VS fue descrito inicialmente en 1961 por Waterson et. al., él menciona que el virión contiene una envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula hospedera donde el virus se replicó, embebidas en la membrana se

encuentran unas estructuras llamadas “espículas” con una longitud de 8 a 12 nanómetros (nm), son pleomórficas con un diámetro de 100-300 nm (Fig. 1). Su genoma esta encapsidado por la proteína de nucleocápside, a su vez la proteína de matriz, la fosfoproteína y la proteína larga, forman la polimerasa viral. Además, el virión contiene dos glicoproteínas transmembranales, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (H) la cual sirve para el acoplamiento al receptor de la superficie celular.

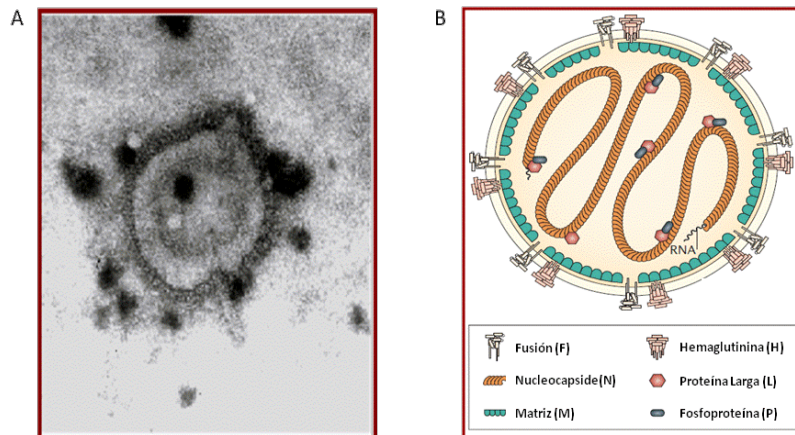


Figura 1. A) Micrografía electrónica del virus de Sarampión, tomada del National Institute of Virology, Indian Council of Medical Research. B) Diagrama esquemático de la estructura del Virus de Sarampión.

4.4 Genoma

El VS es un virus envuelto con un genoma de ARN de cadena sencilla de polaridad negativa (ssARN_{neg}) de aproximadamente 15,894 nucleótidos (nct). Posee un solo promotor ubicado en la región 3´ extra-cistrónica de 50 nct llamada secuencia líder, además contiene otra región extra-cistrónica en el extremo 5´ de

50 a 161 nct llamada tráiler. Estas regiones controlan la transcripción y replicación del genoma del VS. El genoma codifica para 6 genes, cada uno de ellos posee al inicio y al final secuencias transcripcionales conservadas que permiten el inicio (UCCC/N/GGU) y término de la transcripción (AUUUUU). Sin embargo, también contienen regiones intergénicas que presentan una secuencia conservada (GAA). El genoma codifica para seis proteínas estructurales: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), hemaglutinina (H), fusión (F) proteína y la proteína larga (L) y dos no estructurales V y C (Figura 2).

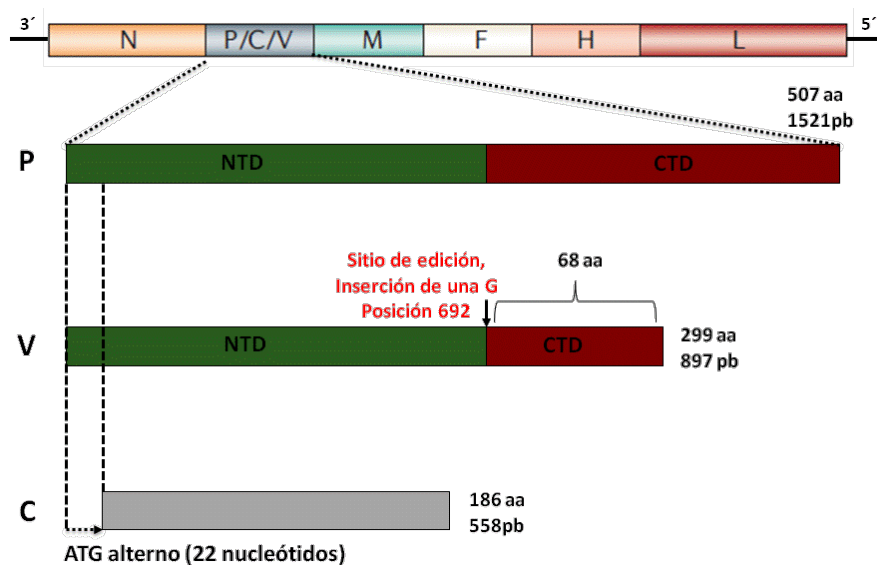


Figura 2. Diagrama de organización del genoma del virus de Sarampión.

4.5 Proteínas

El VS cuenta con seis proteínas estructurales; una nucleocapside helicoidal (1.2 μ de longitud) que se asocia a la fosfoproteína y a la proteína larga formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) que sirve como polimerasa viral. La proteína

de matriz favorece el ensamblaje y otorga una estructura definida al virus. Posee también dos glicoproteínas transmembranales glicosiladas (hemaglutinina y fusión), que son responsables de la unión y entrada respectivamente a la célula hospedera. El gen P codifica para dos proteínas no estructurales adicionales, V y C (6). La proteína V comparte con la proteína P su región amino terminal (N-terminal) pero difiere en su región carboxilo-terminal (C-terminal) (7). La proteína C es una proteína pequeña de 186 aa sintetizada por un codón de inicio (AUG) alternativo en el gen P (8).

4.5.1 Proteína L (Larga)

La proteína larga (2,183 aa) tiene un peso de 250 kDa, es una proteína que se encuentra en pequeñas concentraciones en la célula infectada, tiene la capacidad de unirse a otras proteínas virales debido a que posee un multidominio con regiones conservadas. En la región N-terminal (408 aa) tiene un dominio que interacciona con otro de características tri-helicoidales presente en la región C-terminal de la proteína P para llevar a cabo la transcripción y replicación viral (9).

4.5.2 Proteína N (Nucleocapside)

La proteína N tiene un tamaño de 525 aa con un peso de 60 KDa. Está dividida en un dominio N-terminal, N_{CORE} (aa 1-400), resistente a la proteólisis y una región C-terminal, N_{TAIL} (aa 401-525) el cual es hipersensible a la proteólisis. Una de sus funciones es envolver el genoma viral, el cual posee la secuencia líder que utiliza para formar una estructura helicoidal conformacionalmente flexible (10) y que se

requiere como templado para la replicación y la transcripción (11). N es usualmente retenida en el citoplasma y se encuentra unida a la fosfoproteína (12). La porción amino terminal de N es una región conservada y se requiere para el auto-ensamblaje de la nucleocápside y para la unión al ARN viral (13). La región C-terminal de 125 nucleótidos es altamente variable y pertenece a la familia de las proteínas nativas no plegadas, las cuales son estructuralmente dominios de activación “ácidos” para factores transcripcionales celulares (14). Los ARN mensajeros (mARN) que codifican para la proteína N son los primeros transcritos del genoma y por mucho es la proteína más abundante en las células infectadas. El Ncore forma un dominio globular localizado a través de 6 ejes helicoidales que pueden unirse a la superficie celular a través del receptor de FcγRIIb1 (15). La región N-terminal interacciona con un sitio de unión dependiente de la proteína de shock térmico 72 (Hsp 72) con la cual regula la transcripción compitiendo con la proteína P, un sitio de unión natural para el factor regulador de interferón 3 (IRF3) (16).

4.5.3 Proteína H (Hemaglutinina)

La proteína H tiene un tamaño de 617 aa con un peso de 80 kDa. Es una glicoproteína transmembranal tipo II, se encuentra en las células infectadas y en los viriones formando homodímeros ligados por puentes disulfuro. La región N-terminal de 34 aa es esencial para un adecuado transporte a la superficie celular (17), precedida por una región hidrofóbica transmembranal, un tallo y un ectodominio dominio C-terminal con 13 cisteínas conservadas (18). La proteína H del VS posee 5 sitios de glicosilación entre las posiciones 168 y 238, estas

glicosilaciones son necesarias para el apropiado plegamiento, antigenicidad, dimerización y exporte del aparato de Golgi (19). Por otro lado se sabe que el aa 98 y la región entre los residuos de aa 244 a 250 de la proteína actúan junto con la proteína F durante el proceso de fusión y entrada a la célula hospedera. Modelos tridimensionales muestran que la cabeza globular de la proteína forma una estructura de barril compuesto por seis hojas betas plegadas cíclicamente arregladas alrededor de un eje, como las aspas de una hélice, y bucles que sobresalen de las superficies superior e inferior de cada hoja. Esta estructura es la responsable de la unión a los receptores celulares SLAM o CD150 (Señal Linfocitaria de Activación Molecular) (20) y CD46 (proteína de cofactor de membrana) (21, 22). Diversos estudios *in vitro* han mostrado que el residuo en la posición 481 de la proteína H es determinante para su unión al receptor celular, donde las cepas silvestres del virus utilizan asparagina (N) en la posición 481 para unirse a CD150 y no a CD46. Sin embargo, posterior al proceso de adaptación de la cepa silvestre a cultivos celulares, se sabe que diversas sustituciones (N481Y, E492G, N390I, N416D y T446S) le permiten unirse eficientemente a CD46 para su posterior ingreso a la célula hospedera (23). Adicionalmente a los receptores mencionados, se describió al receptor DC-SIGN (Lectina tipo C/ Molécula de adhesión intercelular tipo 3 específica de células dendríticas) como otro receptor que incrementa la diseminación viral y favorece la infección en cis de linfocitos T (24). Sin embargo, su mecanismo no había sido descrito; recientemente el grupo de Schneider-Schaulies mostro que la interacción del VS y el DC-SIGN en la superficie celular activa (vía MAP-Cinasas) a la esfingomielina de la membrana

plasmática, lo cual deriva en la formación de plataformas ricas en ceramidas que concentran al receptor y permiten la entrada del virus (25). Por otro lado, dos grupos de investigación independientes identificaron a un cuarto receptor para el VS; PVRL4 (proteína tipo receptor de poliovirus o Nectina-4)(26, 27), localizado exclusivamente en la cara basolateral de las células epiteliales. Esto correlaciona con la observación en la que las células epiteliales no pueden ser infectadas por el VS por la cara apical.

4.5.4 Proteína F (Fusión)

La proteína F es una glicoproteína tipo I altamente conservada, es sintetizada como un precursor (F_0) de 60 KDa. La proteína F es responsable de la fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática celular para iniciar la infección, es un trímero con una cabeza globular unida a los dominios transmembranales a través de un tallo helicoidal que consiste en dos hepta regiones que forman un manojo de 6-hélices anfipáticas (28). El VS debe de superar dos barreras de lípidos para poder ingresar su contenido genómico al citoplasma de la célula hospedera, se ha demostrado que la proteína F tiene la capacidad de unirse a las dos bicapas de lípidos mediante cambios conformacionales irreversibles que permiten fusionar las dos membranas, conduciendo a la creación de un poro que permite el acceso al material genómico viral al citoplasma, esto requiere un procesamiento previo de la proteína precursora F_0 , la cual sufre un corte proteolítico por una proteasa tipo furina en el aparato de Golgi en cinco residuos básicos (Arg-Arg-His-Lys-Arg) en la región 108 a 112. Esto produce dos subunidades peptídicas F_1 y F_2 unidas por un

enlace disulfuro de 40 y 20 KDa respectivamente (29). La subunidad F₁ está ligada covalentemente a una membrana distal de la subunidad F2 glicosilada. El corte proteolítico deja el péptido de fusión F1 expuesto y listo para ser insertado en la membrana (29).

La subunidad F1 contiene una región altamente conservada de aa hidrofóbicos en la región amino terminal (aa 113-145), los cuales se ha postulado que juegan un papel muy importante en el proceso de fusión. Oligopéptidos casi idénticos en este segmento de F₁ inhiben la actividad fusogénica (30). Algunos estudios utilizando mutantes resistentes a este efecto inhibitor de fusión, particularmente en los aa de la región rica en cisteínas (337 a 381) de F₁, han mostrado que son importantes para la interacción con H (31). La fusión requiere la expresión de F y H, así como su unión al receptor celular (32). La cola citoplásmica de 33 aa de F1 posee un arreglo basolateral y señales de endocitosis, la expresión basolateral de H y F son importantes para la formación de sincicios y el incremento de la diseminación célula-célula *in-vitro* e *in-vivo* (33). Algunas mutaciones, codones de paro prematuros, mutaciones sin sentido, alteran el marco de lectura estos cambios interfieren con el ensamblaje de la envoltura viral y la gemación e incrementan la fusión célula-célula (34). La subunidad F2 posee todos los sitios de N-glicosilación (Asp/29, 61 y 67), la mutación de cualquiera de estas asparaginas disminuye el transporte a la superficie celular y deteriora el corte proteolítico, la estabilidad y la capacidad de F, presumiblemente mediante la pérdida de la conformación de F2(35).

4.5.5 Proteína M (Matriz)

La envoltura del virión está conformada por las proteínas F, H y M, ésta última posee un tamaño de 355 aa con un peso de 37 KDa , es una proteína básica con varios dominios hidrófobos muy conservados (36). En las células infectadas, la proteína M se asocia con la nucleocápside y con la capa interna de la membrana plasmática, al mismo tiempo interactúa con las regiones intracitoplasmáticas de una o ambas glicoproteínas, modula también la focalización y la capacidad fusogénica de las glicoproteínas de envoltura y dirige la liberación de los virus por la cara apical de las células epiteliales (37). Casualmente, mutantes del VS carentes de la proteína M aumentan la capacidad de fusión célula-célula y disminuyen la producción de virus infecciosos (38).

4.5.6 Proteína P (Fosfoproteína)

La proteína P tiene un tamaño de 507 aa con un peso de 72 KDa, es un cofactor de la polimerasa viral y es activada por fosforilación, forma trímeros, y está ligada al complejo de replicación que forma junto con las proteínas L y N (39). La proteína P es abundante en las células infectadas pero solo una pequeña parte está presente en el virión. P está conformada por una región N-terminal, un parte central y una región C-terminal. La región N-terminal (aa 1-231) está pobremente conservada, no está estructurada, es ácida, se encuentra fosforilada y es esencial para la replicación. La región N-terminal se une a la región central e induce el correcto plegamiento del N-terminal(40). La región C-terminal (aa 232-525) está muy conservada y contiene todos los dominios requeridos para la transcripción, en

particular, la región de unión a la polimerasa (41), además de contener las secuencias responsables de unión a la RNP (42). La porción única XD en la región C-Terminal del aa 459-507 tiene tres hélices arregladas en una triple hélice antiparalela que se une a la última región de la proteína N e induce su plegamiento (43). Los virus de la familia *Paramixoviridae* expresan una o dos proteínas no estructurales. En el caso del VS, por solapamiento del marco de lectura abierto (MLA) codifica para dos proteínas adicionales que son V y C.

4.5.7 Proteína V

El gen de la proteína V (299 aa) con un peso de 45 KDa, se transcribe a partir del mismo codón de inicio (AUG) que el gen de la proteína P, de esta manera comparten la región N-terminal de 231 aa. Sin embargo, la región C-terminal de 68 aa de V es única debido a la inserción transcripcional de un nucleótido de guanidina en la posición 692 provocando un corrimiento en el marco de lectura que genera mRNA que difiere de P (7, 44). De hecho, los *paramixovirus* son identificables por su dominio carboxilo terminal de la proteína V, la cual contiene un dominio rico y conservado de cisteínas (DRC) (45). El DRC de todas la proteínas de los *paramixovirus* son 50% idénticos e invariablemente incluyen una histidina y 7 cisteínas capaces de unir dos átomos de zinc (46). Recientemente, mediante estudios de cristalografía se confirmó que las DRC de la proteína V forman un único dedo de zinc (47) capaz de unir a factores transcripcionales e inhibir la señalización para la producción de Interferón α/β (48), vía STAT 1 y 2 (49), y actuando como señuelo para la cinasa I κ B (50).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la proteína V de los *paramixovirus* inhiben la respuesta de IFN α/β (51), previenen la apoptosis (52), alteran el ciclo celular (53), inhiben la señalización de los ARNs de doble cadena (45). En la mayoría de estos casos estas actividades están relacionadas sólo a la proteína V (54, 55). Además posee la capacidad de unirse a p65 (RelA) y con ello suprime la actividad de NF κ B, disminuyendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias (56). Sin embargo, estudios recientes han mostrado, que al igual que la proteína V, C (57, 58) y la proteína P tiene que ver con la inhibición de la fosforilación de STAT1, afectando la señalización para la producción de IFN tipo 1 (54).

4.5.8 Proteína C

La proteína C es una proteína no estructural pequeña de 186 aa con un peso molecular de 21KDa, básica (PI=10), fue descrita inicialmente en 1985 (8). La proteína C es traducida a partir de un solapamiento del marco de lectura en la región 5' del marco de lectura de P, es decir utiliza un codón de inicio (AUG) alternativo presente 22 nucleótidos adelante del sitio de inicio de la transcripción de la proteína P. Una comparación de secuencias de aa de las proteínas C de cepas vacunales y virus silvestres de sarampión demostraron que existe una variabilidad considerable en la región N-terminal en por lo menos 45 aa, mientras que el 75% de la secuencia de la proteína es muy conservada (59). La función de esta proteína ha sido revelada parcialmente en los últimos años.

5. Epidemiología

El virus del sarampión se estableció en los seres humanos hace unos 5,000 a 10,000 años en las civilizaciones del Medio Oriente, esto sucedió sólo cuando las poblaciones alcanzaron un número suficiente para mantener la transmisión del virus (60). En poblaciones donde el sarampión es endémico, se presenta un patrón típicamente temporal, caracterizado por epidemias estacionales anuales superpuestas en ciclos epidémicos de 2-5 años. Estos ciclos son el resultado de la acumulación de susceptibles, debido a nuevos nacimientos, no vacunados o fallas a la vacunación.

El virus del sarampión es uno de los agentes patógenos más contagiosos, tiene la capacidad de producir brotes en poblaciones en las que menos del 10% de las personas son susceptibles. El sarampión sigue siendo un problema de salud pública en prácticamente todo el mundo, inclusive en países con un historial de control exitoso (61, 62). Por otro lado, no existen reservorios animales y sólo puede mantenerse en poblaciones humanas por una cadena ininterrumpida de infecciones agudas, se menciona que el virus no causa una infección persistente o prolongada y que estos hechos harían posible su erradicación. Sin embargo, estudios han demostrado que los niños infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1), presentan un deterioro en la inmunidad mediada por células, lo que favorece la excreción del VS por tiempos más prolongados (63) y a su vez incrementan el periodo de infectividad y la diseminación viral. Por ésta y otras razones, en la actualidad continúa habiendo un

gran número de muertes atribuibles a sarampión particularmente en menores de 5 años de edad. En el año 2003, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobó una resolución en la que instó a los países miembros a reducir el número de muertes atribuidas al sarampión en un 50% para finales del 2005 (64). En relación a esto, se observó que la mortalidad por sarampión se redujo en un 60% partiendo de un estimado de 873.000 muertes en 1999 (63,4000-114,0000) a 345.000 muertes en 2005 (247,000 a 458,000) (Fig.3) (65). Los últimos datos de mortalidad en el 2008 muestran una reducción a 164 000 muertes atribuibles al sarampión (115,000-222,000) (66). La meta de la OMS para el 2015 es reducir la mortalidad mundial por sarampión en un 90% (67). En México, han disminuido drásticamente los casos de sarampión (95%) gracias a la vacunación implementada a partir de 1990. La última defunción reportada por sarampión en México se dió en 1995, para 1996 se observaron los dos últimos casos de sarampión autóctono y para 1997 se declara erradicado el sarampión en México. Entre 1997 y principios del 2000 no se presentó ningún caso. Entre el 2000-2003 el virus se reintrodujo en dos importaciones distintas (genotipo asiático H1), la primera con la presencia de 34 casos en dicho periodo y la segunda en el año 2004 (64 casos) afectó principalmente a una población entre los 15 y 40 años de edad (70%), así como en menores de un año. Entre el 2005 y 2006 se presentaron 29 casos, para el 2007-2008 no se reportó ningún caso. Nuevamente entre el año 2009 y hasta primera semana de junio del presente año se han reportado 12 casos(68) (Fig. 3). Se ha mencionado que los brotes ocasionales de sarampión son debido a importaciones del mismo y se deben particularmente a la falta de vacunación, inmunización

parcial, fallas primarias y/o secundarias a la vacuna, en conjunto esto genera grupos de personas susceptibles a padecer la enfermedad(69).

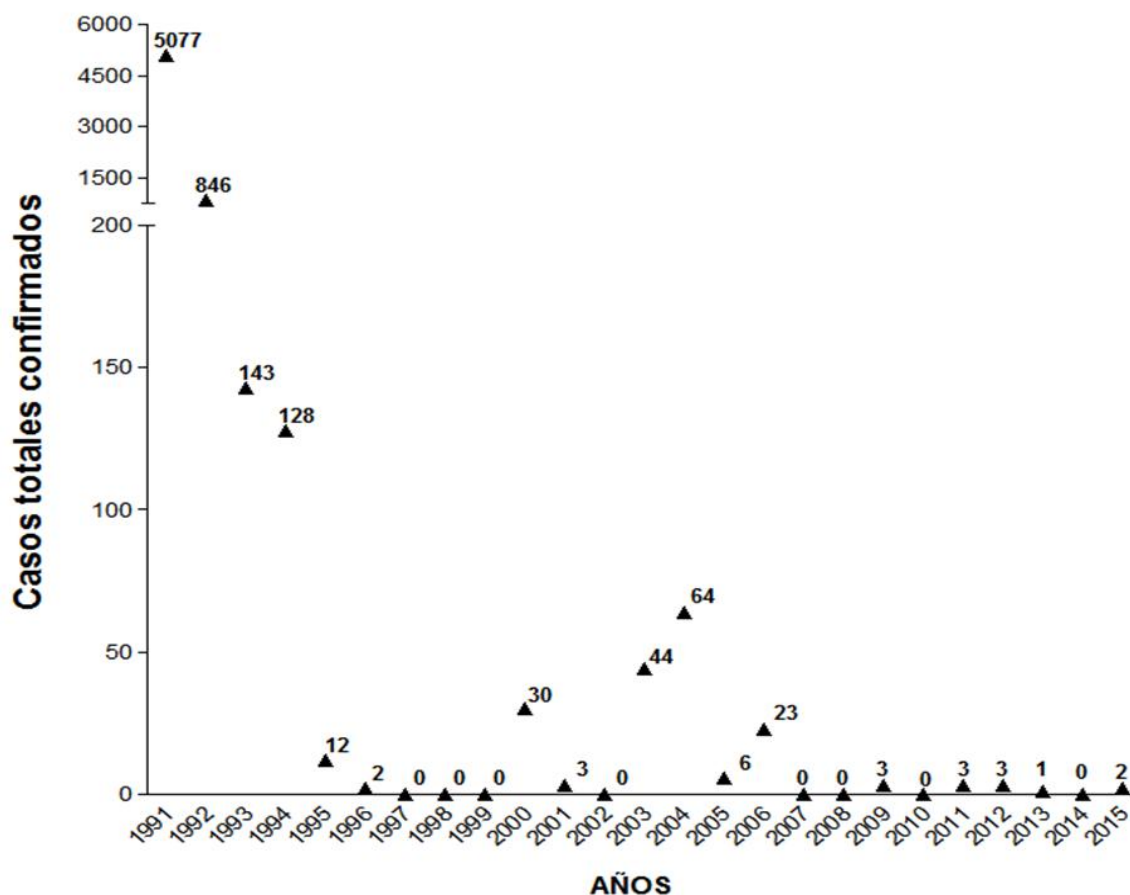


Figura 3. Morbilidad por el virus de Sarampión en México 1991-2015.

El sarampión afecta principalmente a los bebés y niños menores de 5 años, particularmente en los entornos urbanos densamente poblados con baja cobertura de vacunación. Las causas por las cuales se contrae el sarampión en edad pediátrica generalmente tienen que ver con la tasa de disminución de anticuerpos maternos circulantes, la cantidad de contactos con personas infectadas, y el nivel

de cobertura de la vacuna contra sarampión. A medida que aumenta la cobertura de vacunación o disminuye la densidad de población, la distribución por edades se desplaza hacia los niños mayores e incluso podría incidir en la adolescencia y la edad adulta. La evidencia sugiere que la mortalidad por sarampión es 5% mayor en las niñas que en los niños dependiendo la edad y regiones en las que se encuentren (70).

6. Cuadro Clínico

Los síntomas asociados a la enfermedad pueden ser fiebre, conjuntivitis, coriza, tos y manchas de Koplik en la mucosa bucal (característica patognomónica). Los síntomas prodrómicos se intensifican varios días antes de la aparición del exantema. El eritema y el exantema maculopapular aparecen primero en la cara generalmente por detrás de las orejas y se disemina hacia las extremidades. El exantema tiene una duración de 3-5 días y se desvanece de la misma forma como apareció (71). Los niños desnutridos pueden desarrollar una erupción muy pigmentada que descama durante la recuperación (72).

En el sarampión no complicado, la recuperación clínica comienza poco después de la aparición del exantema. La enfermedad es más grave en los lactantes (menores de un año) y en los adultos. Las complicaciones asociadas a la infección por sarampión incluyen laringotraqueobronquitis (crup), otitis media, diarrea, queratoconjuntivitis. Sin embargo, la complicación más frecuente en el tracto respiratorio bajo es la neumonía, el riesgo de padecerla incrementa

importantemente por la supresión inmune inducida por el virus del sarampión (73), generalmente causada por infecciones virales o bacterianas secundarias. La Encefalomiелitis post-sarampión es una complicación grave poco frecuente que compromete al sistema nervioso central (SNC), se presenta aprox. 2 semanas después de padecer la enfermedad en uno por cada 1.000 pacientes, sobre todo en niños mayores y adultos. Se caracteriza por presentar fiebre, convulsiones y desmielinización peri-ventricular en el cerebro, sugiriendo que la encefalomiелitis post-sarampión es una enfermedad autoinmune (74).

Otras complicaciones del SNC que pueden sobrevenir meses o inclusive años después de la infección aguda por sarampión y son Encefalitis por cuerpos de inclusión (ECI) y Panencefalitis Esclerosante Subaguda (SSPE), las cuales son causadas por la infección con un virus de sarampión persistente. La ECI se presenta generalmente meses después de la infección. Es una rara pero fatal complicación asociada al deterioro neurológico progresivo que afecta a las personas con inmunidad celular defectuosa, se ha descrito particularmente en niños con trasplante renal (75) o de células madre (76). Se cree que pudiera afectar a personas infectadas con VIH. La SSPE es una rara complicación que se produce en aproximadamente uno de cada 10,000 a 100,000 pacientes (77) y se caracteriza por convulsiones y deterioro progresivo de las funciones cognitivas y motoras, seguido de la muerte entre 5-15 años después de la primoinfección. La SSPE ocurre con mayor frecuencia en personas infectadas con el virus del sarampión antes de los 2 años de edad. Afortunadamente los programas de

vacunación contra el sarampión han disminuido importantemente la incidencia de SSPE (78).

7. Patogénesis

La patogénesis del sarampión está basada en el conocimiento conjunto en el campo de la virología e inmunología. El VS ingresa al organismo humano por vía aérea mediante gotitas de saliva que se propagan de una persona infectada a otra y producen la enfermedad. La replicación viral inicia en la mucosa del tracto respiratorio para posteriormente alcanzar el epitelio alveolar (79), seguido de esto, se presentan dos viremias; la primera viremia afecta directamente a las células del retículo endotelial y células hematopoyéticas en el lumen, las cuales se encargan de transportar el virus a ganglios linfáticos. La segunda se disemina por vía hematogena alcanzando rápidamente tejidos como el bazo, tejido linfático, pulmones, timo, hígado y piel (80). Las glicoproteínas que conforman al virus son detectadas particularmente en monocitos y en una menor cantidad en linfocitos (81).

La infección de las células inicia por la unión de la glicoproteína H del VS a su receptor celular, con la finalidad de ingresar su material genético al citoplasma celular. Hasta la fecha, se han identificado 3 receptores para el VS que permiten la infección (Fig.4). El primer receptor identificado fue CD46, el cual se expresa de forma ubicua en todas las células nucleadas del humano, es un receptor para las cepas vacunales y cepas adaptadas en el laboratorio *in vitro*(21, 22). El segundo

receptor identificado es CD150 o SLAM, expresado sólo en ciertas células del sistema inmune como linfocitos T y B activados, células dendríticas maduras y macrófagos, es un receptor para el virus silvestre, cepas vacunales y cepas adaptadas en el laboratorio (20). Recientemente, se describió un tercer receptor, nectina 4 [también llamado poliovirus-receptor-like-4 (PVRL4)], se expresa en todas las células epiteliales y al igual que CD150 es capaz de unir al virus silvestre, cepas vacunales y cepas adaptadas en el laboratorio (26, 27). Para poder discernir qué tipo de receptor utilizan las diferentes cepas del VS *in-vivo* se han utilizado varios modelos animales(6) como ratas, hámsters, ratones y hurones. Sin embargo, los primates no humanos son los únicos animales que presentan una enfermedad aguda similar a la observada en los seres humanos. Avances recientes en el estudio de la patogénesis y el tropismo del VS, han incluido el uso de virus que expresan la proteína verde fluorescente (EGFP), de esta manera se ha demostrado que posterior a la infección intratraqueal o por aerosol en monos *Rhesus*, las principales células diana para el VS silvestre son macrófagos alveolares y células dendríticas (DCs) (82). Este resultado es consistente con el hecho de que SLAM es un receptor para el virus silvestre en estas células. Sin embargo, a la par se observó que existía una infección de células epiteliales ciliadas en la tráquea y pulmones de estos monos. Un número importante de trabajos menciona que tras la infección por el VS silvestre el objetivo principal son las células epiteliales. Sin embargo, SLAM no se expresa en este tipo de células sugiriendo la presencia de otro receptor para este virus. Nectina-4 es el nuevo receptor descrito para el VS silvestre. En este sentido, se infectó a monos *Rhesus*

por conjuntiva y fosas nasales, con una cepa que sólo reconoce SLAM y no Nectina-4, esto debido a la introducción de mutaciones de aminoácidos en la proteína H (83). Se observó que los monos presentaron signos clínicos de la enfermedad pero no se propagó en pulmones, indicando la importancia de Nectina-4 para que se presente una viremia. De forma inversa, cuando se empleó una cepa que sólo reconoce Nectina-4 pero no SLAM, se observó que no se presentan síntomas clínicos, indicando que SLAM es necesario para la virulencia y patogénesis (84).

Las cepas vacunales y adaptadas al laboratorio del VS pueden utilizar cualquiera de los tres receptores celulares para ingresar a la célula *in vitro*. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el utilizar una cepa silvestre del VS que expresa una hemaglutinina de cepa vacunal o adaptada a laboratorio más EGFP, infecta sólo a linfocitos, indicando que el receptor CD46 no actúa como un receptor para estas cepas *in vivo*. (85)

Por otro lado, la replicación de las cepas vacunales y adaptadas al laboratorio del VS *in vivo* en el modelo de monos *Rhesus* está muy restringida, pero no así la de los virus silvestres, probablemente debido que estas cepas sufrieron un proceso de atenuación. Se sabe que posterior a este proceso, la gran mayoría de las mutaciones se presentan en las secuencias que codifican para los genes P/V/C (86-89), los cuales son muy importantes para antagonizar la respuesta de IFN (90). En este sentido, se sabe que las cepas silvestres del VS, inhiben la producción de interferón tipo I, a diferencia de los virus adaptados y cepas vacunales, las cuales

si lo permiten; esto tiene un impacto en el desarrollo de la respuesta inmune del hospedero al VS.

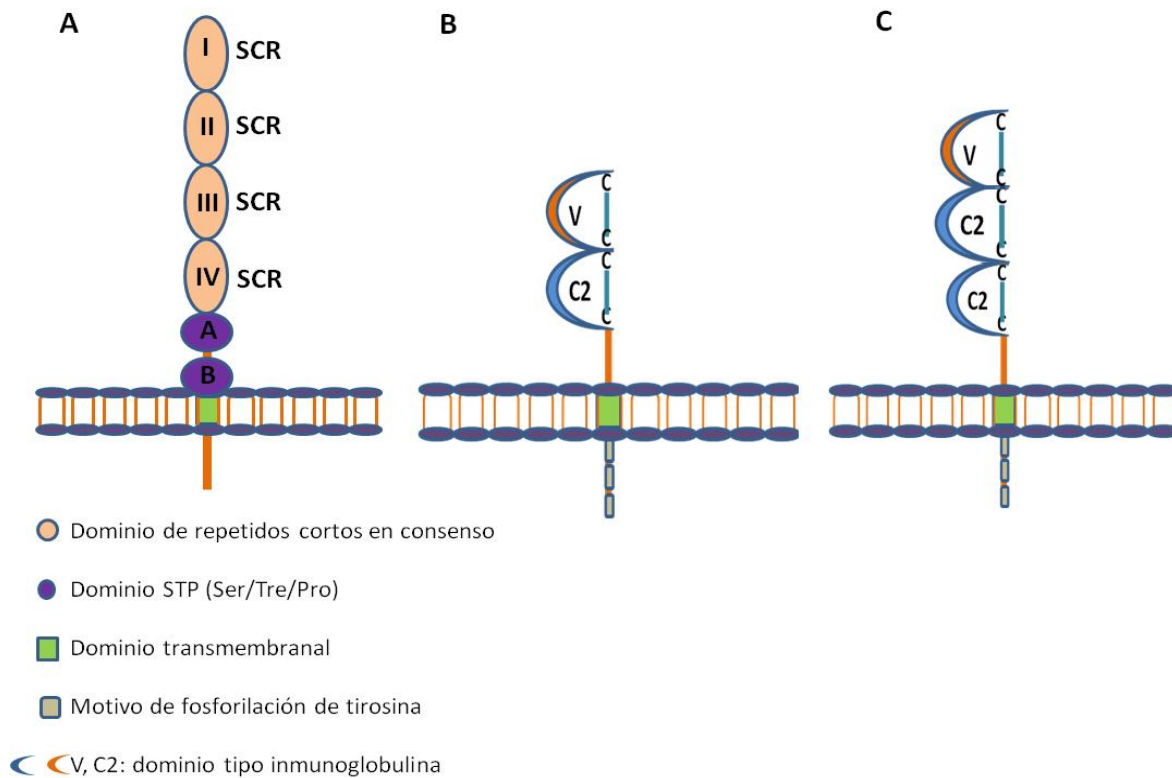


Figura 4. Receptores para el VS A) CD46, B) CD150, C) Nectina-4

8. Respuesta Inmune al VS

8.1 Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato (SII) está evolutivamente conservado y es la primera línea de defensa en la protección del hospedero ante patógenos (91).

El SII detecta a los diferentes microorganismos mediante la interacción con receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), particularmente de los

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), a través de los receptores y sus ligandos se desencadena una respuesta antiviral en la célula (92). Hasta el momento se han identificado tres familias de sensores de PAMPs: los receptores tipo Toll (TLRs) expresados en el espacio extracelular y compartimentos endolisosomales (93), receptores NOD-like (NLRs) (94) y receptores tipo RIG-I (RLRs) (95) estos últimos dos expresados exclusivamente en el citoplasma celular. Los miembros de la familia TLR reconocen PAMPs asociados a bacterias, virus, hongos y protozoos; los NLRs detectan bacterias, y RLRs detectan material genético viral. Es muy probable que la interacción entre estas familias asegure la coordinación eficaz de la respuesta inmune innata, ya sea a través de señalización sinérgica o cooperativa. Hasta el momento se conocen 11 miembros de la familia de los TLRs en humanos (TLRs/Ligando; 1/lipoproteínas, 2/Peptidoglicano, Zymosan, 3/dsRNA, 4/Lipopolisacárido, 5/Flagelina, 6/Lipoproteína, 7/ssRNA, 8/ssRNA, 9/CpG-DNA, 10/No definido, 11/Profilina) (96). Los TLRs señalizan exclusivamente a través de la molécula adaptadora inductora de IFN- β , que contiene el dominio TIR (TRIF) y la molécula adaptadora MyD88 (MyD88), las cuales a su vez por medio de secuencia de fosforilaciones, reclutan otras moléculas asociadas, por un lado con el receptor de interleucina 1 (IL-1R), cinasas (IRAK1 e IRAK4), estas median la activación y translocación al núcleo del factor regulador de interferón 7 (IRF7) (97). Y otra; la asociación del IL-1R, MyD88, IRAK4 y el receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TRAF6), las cuales activan a las cinasas IKK alfa (iKK α) e iK beta (iK β) (98), defosforilando al inhibidor del factor de transcripción de NF κ B (99). Los RLRs reconocen el material genético

(ssARN y dsARN) viral por medio de las helicasas de ARN citosólicas tipo: RIG-I (gen I inducido por ácido retinoico), MDA5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma), y a LGP2 (laboratorio de genética y fisiología 2) (100, 101). La detección del ARN viral inicia la activación de factores de transcripción como IRF3 e IRF7, así como NFκB. Para ambos casos, la translocación de estos factores transcripcionales al interior del núcleo, induce la transcripción de genes relacionados a IFN y citocinas pro-inflamatorias(101).

El IFN tipo 1 consiste particularmente del IFNβ e IFNα, son un componente fundamental en la respuesta inmune innata contra virus. Estas citocinas inmunomoduladoras se producen particularmente en células infectadas por virus y sirven en la respuesta inicial para inhibir la replicación viral y al mismo tiempo prevenir la infección de células contiguas. Por otro lado también colaboran al inicio de la respuesta inmune adaptativa, debido a que incrementan la maduración de células dendríticas (DCs), activan a los macrófagos y extienden el tiempo de vida media de los linfocitos T (102, 103), formando un puente efectivo entre la respuesta inmune innata y adaptativa (102, 103). Los productos de los genes estimulados por IFN usualmente poseen la actividad de inhibir el crecimiento viral y afectan varios pasos del ciclo de replicación viral. Las proteínas antivirales inducibles por IFN más caracterizadas son proteincinasa R dependiente de ARN de doble cadena (PKR), la 2-5 oligoadenilatosintetasa y la proteína Mx, que juegan un papel en la inhibición de la traducción viral, el rompimiento del ARN viral y el secuestro de proteínas respectivamente (104, 105).

El IFN de tipo I, a través de su receptor (IFNAR), induce la activación de una vía de señalización que termina con la expresión de genes relacionados al IFN. Esta vía inicia con la fosforilación, activación de transductores de señales y activadores de la transcripción 1 y 2 (STAT1, STAT2) a través de la cinasa Janus 1 (Jak1) y la tirosincinasa 2 (Tyk2) (102). STAT1 y STAT2 fosforilados forman un heterodímero junto con el gen del factor 3 estimulado por IFN (ISGF3) juntos se translocan al núcleo y se unen a elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) para producir proteínas inducibles por IFN como: MxA, PKR y la desaminasa de adenosina que actúa sobre el ARN (ADAR1) (106, 107).

La respuesta inmune innata del hospedero contra el virus de sarampión se lleva a cabo en la fase prodrómica (108) y pudiera ser esencial para la eliminación viral, así como para el establecimiento de una buena inmunidad a largo plazo. Sin embargo, hasta el momento poco se sabe de esta respuesta inmune contra el VS y la repercusión que tenga en la generación de una buena respuesta inmune adaptativa. Dentro de la respuesta inmune innata contra sarampión convergen diversos componentes del sistema inmune, uno de los más importantes son las DCs (108). Las DCs, dependiendo de la subpoblación o el estadio de maduración/activación, pueden mediar diferentes funciones inmunológicas. Estas células son un puente entre la inmunidad innata y adaptativa. Convencionalmente a las DCs se les ha nombrado las células centinela del sistema inmunológico y a su vez son las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) por excelencia. El papel que juegan como células presentadoras es muy importante ya

que al estimular a los linfocitos T inician una respuesta inmune específica de larga duración en contra del virus (109-111). Hasta el momento se han descrito dos subpoblaciones de DCs en sangre periférica en los humanos, las DCs mieloides (cDCs) y las DCs plasmacitoides (pDCs). Entre ellas existen diferencias que estriban en su fenotipo y función.

Las pDCs humanas expresan solamente TLR7 y TLR9 (112) , y no TLR2, TLR-3, TLR-4, TLR5, TLR-6, TLR8. El TLR7 media el reconocimiento de material genético de RNA de cadena sencilla (113), mientras que el TLR9 sensa DNA (114). El principal mecanismo descrito para la activación de las pDCs por virus y bacterias es la vía TLR (TLR7/9), al estimular esta vía se secretan citocinas proinflamatorias como TNF α e IL-6 e importantemente IFN α/β , de hecho se ha descrito que las pDCs producen de 100 a 1000 veces más IFN-1 que cualquier otro tipo de células (115). El IFN α/β liberado por las pDCs en respuesta a un estímulo viral protege a diversas células del efecto citopático de los virus, aumenta la citotoxicidad de las células NK y linfocitos TCD8⁺, aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras MHC-I y II en las DCs, monocitos, y al mismo tiempo inducen la secreción de IFN γ por las NK, linfocitos TCD8⁺ y TCD4⁺ cooperadores (114). A través de la secreción de IL-6, IFN α y del contacto CD70/CD27 las pDCs promueven la diferenciación de los linfocitos B de memoria a células plasmáticas productoras de anticuerpos(116). Las pDCs humanas presentan péptidos cruzadamente en asociación con MHC-I in vitro tan eficientemente como las cDCs(117), particularmente a linfocitos TCD4 y TCD8 de memoria (118). Sin

embargo, se sabe que producen TNF- α , IL-6, IL-8, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 (119, 120) y el péptido antimicrobiano β -defensina humana (HBD-1) (121) pero no IL-1 α/β , IL-3, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN γ , linfotoxina α y GM-CSF (122). Anteriormente, se pensaba que la patogénesis del sarampión iniciaba con la infección de las células epiteliales respiratorias seguido de una viremia mediada por monocitos. Sin embargo, el receptor del VS (SLAM) no se expresa en estas células (123). Ahora se sabe que las DCs y los macrófagos de pulmón son las células blanco iniciales de la infección por el VS, en este sentido, Bieback et. al. describió en DCs y macrófagos, que la interacción de la proteína H del VS con el receptor Toll tipo 2 (TLR-2) induce la producción de IL-6 y la expresión de SLAM en la superficie celular, esto contribuye a la diseminación viral y a la activación del sistema inmune (124). En el mismo sentido, la infección de las células epiteliales se produce más tarde en la infección, a través del receptor nectina-4 (26). En respuesta a la infección estas células producen IL-8 (125), una potente citocina quimio-atrayente lo cual favorece la diseminación viral a través de linfocitos T y B pero no monocitos (79).

Previo a la identificación de las DCs como un blanco primario de la infección por el VS silvestre *in-vivo*, se demostró que las DCs *in-vitro* son altamente susceptibles a ser infectadas por esta cepa y esto lleva a la formación de sincicios y viriones infecciosos (126). El papel de las pDCs en la infección por el VS no es claro y los resultados han sido contradictorios (88, 127, 128). Se sabe que las pDCs no expresan el receptor SLAM (tampoco nectina-4) y se sabe que las cepas silvestres

y vacunales del VS (EGFP) no utilizan el receptor CD46 *in-vivo* para ingresar a la célula. Sin embargo, algunos trabajos *in-vitro* han demostrado que el VS silvestre si ingresa a estas células, ya que se ha detectado el genoma del VS, pero no se observó que produzcan sincicios o viriones infecciosos (88). En el mismo sentido, se ha observado que la sensibilidad del VS, mediada por la producción de IFN al inhibir la acidificación endosomal con cloroquina, sugiere que la entrada del VS a las pDCs está mediada principalmente por endocitosis o macropinocitosis (127). Esto difiere de otros paramixovirus como el RSV, el cual requiere la replicación viral para que exista la producción de IFN (Fig.5) (129). Sin embargo, el mecanismo de entrada del VS silvestre a las pDCs, así como los receptores específicos aún no han sido dilucidados.

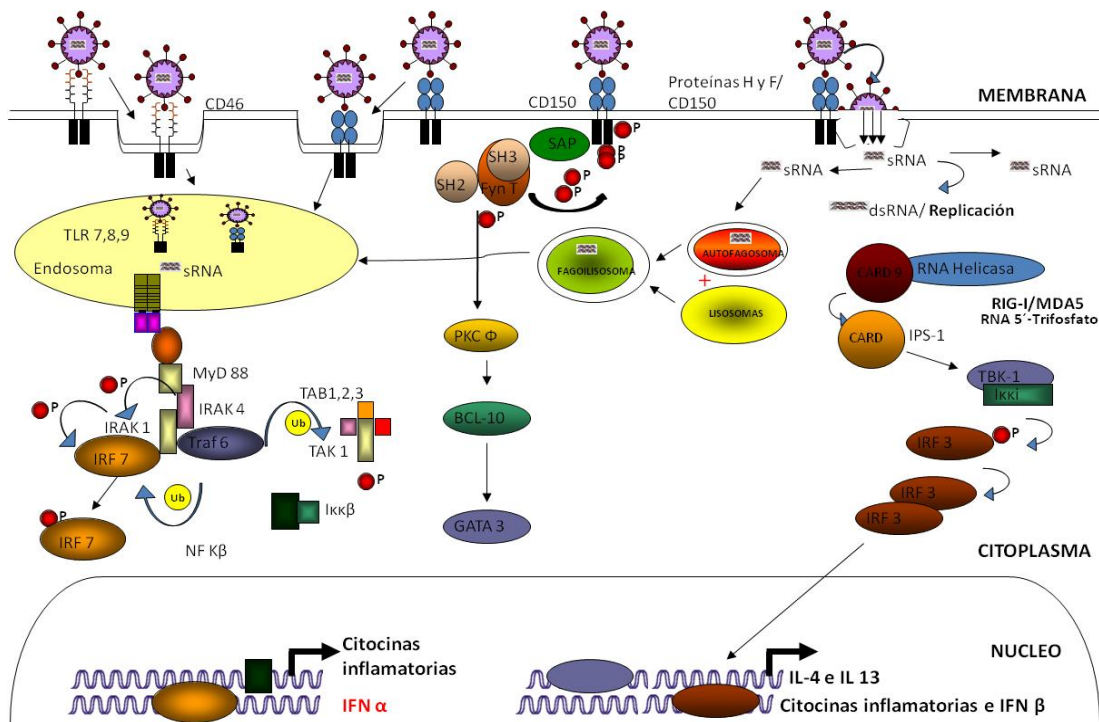


Figura 5. Vías de señalización para la producción de IFN-I y citocinas proinflamatorias inducidas por el VS.

8.2 Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa contra sarampión se compone de la respuesta celular y/o humoral(4). Posterior a la infección con el VS se observa una importante secreción de citocinas como IFN γ e IL-2 que polarizan la respuesta hacia Th1 y en una fase más avanzada de la enfermedad prevalece una respuesta tipo Th2 (IL-4,IL-5,IL10) (130). Se ha descrito que durante la fase aguda del sarampión, se detecta en plasma un aumento de la concentración de interferón tipo II (IFN- γ), seguido por un cambio, durante la fase de convalecencia, a IL-4 e IL-10 (131). La respuesta inicial con fenotipo Th1 es esencial para la eliminación del virus, mientras que la respuesta con fenotipo Th2, promueve el desarrollo de anticuerpos neutralizantes específicos del VS(5).

La evidencia más clara en lo que se refiere a la inmunidad mediada por células contra el VS, se observó en niños con agammaglobulinemia, en los cuales existe una recuperación total después de la infección por el virus de sarampión. Sin embargo, niños con deficiencias severas en la función de linfocitos T (132) o individuos infectados por el VIH presentan una mortalidad del 50 al 100% después de la infección por sarampión (133). Este hecho claramente sugiere que la inmunidad celular contra el sarampión juega un papel muy importante en la protección a largo plazo.

Los anticuerpos antivirales constituyen una de las principales barreras para evitar la diseminación del virus entre las células y los tejidos, a su vez son especialmente

importantes para impedir la diseminación hematológica y son detectables al momento del exantema (134). Se pueden generar anticuerpos frente a cualquier proteína del sarampión que se encuentre en la célula infectada. Sin embargo, para el control de la infección son más importantes aquellos que están dirigidos contra las glicoproteínas de superficie de los viriones como son las glicoproteínas F y H, estos anticuerpos se denominan neutralizantes y son a su vez los que confieren una adecuada protección de largo plazo al hospedero. En el caso particular de la vacuna de virus vivos atenuados contra sarampión en niños sanos, se ha observado un predominio de la producción de citocinas de la respuesta Th1 (IFN γ e IL-2) (135, 136), generando al mismo tiempo células productoras de anticuerpos tipo IgA, IgM e IgG (IgG1, IgG4), estos últimos se ha observado que persisten, en algunas personas, por muchos años aun sin la re-vacunación (137).

Se han descrito diversas anomalías en la respuesta inmune innata y adaptativa posteriores a la infección por el VS (5). En general todos los miembros de la familia *paramixoviridae*, con la excepción del Virus Sincicial Respiratorio (RSV) y el Metapneumovirus (MPV), codifican un gen P que produce más de una especie de polipéptido. En el caso del VS, el gen P posee dos mecanismos principales para generar otras proteínas (138). El primer mecanismo se ha denominado "edición del ARN", este mecanismo implica la producción de mARNs cuyo marco de lectura abierta (ORFs) se altera, mediante la inserción de residuos G en una posición específica en el ARNm (Proteína V). El segundo mecanismo implica el inicio de la traducción en los ribosomas mediante codones de inicio alternativos (Proteína C). Mediante la producción de estas proteínas diversos

autores han mostrado un análisis detallado de cómo antagonizan la inmunidad y básicamente lo realizan de dos maneras: mediante la regulación de la síntesis del ARN viral evitando ser detectados por los PRRs y por la inhibición directa de las vías de señalización de la célula hospedera por medio de sus proteínas.

La respuesta inmune observada en la infección del VS paradójicamente está asociada a una respuesta disminuida a otros antígenos, un efecto que dura varias semanas o inclusive meses después de la resolución de la enfermedad aguda (139). Posterior a la infección por el VS, la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada a tuberculina esta suprimida (140) y la respuesta inmune celular y humoral a nuevos antígenos está afectada (141). Estas anomalías de la respuesta inmune se han relacionado a una linfopenia transitoria con particular reducción en linfocitos TCD4 y TCD8(142), que funcionalmente se observa como una disminución de la respuesta linfoproliferativa (143), también la función de las DCs está afectada(142), existe un predominio de la respuesta tipo TH2 con lo cual se disminuye la producción de citocinas como el IFN γ e IL-12 (144), concentraciones elevadas de IL-10 y TGF β , lo que se relaciona directamente con el aumento en las concentraciones de linfocitos T reguladores (Treg) (145). Recientemente en un modelo de macacos infectados por el VS, se observó una inmunosupresión sistémica y la pérdida de la inmunidad de memoria a otros antígenos diferentes a sarampión, interesantemente la vacunación contra sarampión en este modelo no genera estos cambios(146). En relación con este estudio, Mina et. al. demostró en un estudio epidemiológico, que posterior a la infección por el VS, existe una

reducción de la inmunidad de memoria inmunológica contra otros antígenos adquiridos por enfermedad o vacunación, lo que sugiere que la inmunosupresión que se creía transitoria (semanas y meses) puede extenderse aproximadamente por 2 o hasta 3 años post-infección(147).

9. Vacunas

En 1954 Enders y Peebles, aislaron por primera vez la cepa viral a partir de células renales provenientes de una necropsia realizada a un paciente de nombre Edmonston (148). Entre 1958 y 1960, Katz y Enders, obtuvieron las cepas Edmonston A y B, las dos cepas fueron atenuadas en distintos pases en fibroblastos de embrión de pollo, la cepa Edmonston B presenta 6 pases extras, en tanto que la cepa A posee sólo uno(149). En 1962, Schwarz sometió a 77-85 pases extra a la cepa Edmonston A, obteniendo una cepa hiperatenuada conocida como “cepa Schwarz” (150). En 1967, en el Instituto de Inmunología Zagreb en Yugoslavia, sometió la cepa Edmonston B a 19 pases en células diploides humanas, obteniendo como resultado la cepa Edmonston-Zagreb, la cual fue adoptada en México en 1976 y producida por el Instituto Nacional de Virología (Fig.6) (151). Por otro lado, para poder emplear el virus de sarampión en vacunas para humanos es necesario que estas cepas adquirieran un fenotipo atenuado, se ha sugerido que este fenotipo obedece a una serie de mutaciones en el genoma viral del virus silvestre (89).

La vacunación en México inició en 1971 como parte de un programa interinstitucional de inmunización nacional, con la aplicación de más de 3.5 millones de dosis únicas. Los resultados de esta vacunación dieron notables resultados (152). En la actualidad se sabe por diversos estudios que dos dosis de la vacuna de sarampión por vía subcutánea son suficientes para conferir protección hasta en un 90% en las personas susceptibles. Este esquema de vacunación se inició en México como resultado de la epidemia de 1989-1990, donde se presentaron más de 100,000 casos con más de 6,000 defunciones (153).

La aplicación de una primera dosis vacunal a los 12 meses de edad con un refuerzo a los 6 años, dio como resultado una disminución dramática (90%) en los casos de sarampión; este esquema ha demostrado controlar los brotes y evitado la transmisión del virus. Sin embargo, a pesar de este esquema sostenido de vacunación, existen poblaciones susceptibles debido a que existen fallas primarias y secundarias a la vacunación. Hasta el momento no se ha logrado erradicar por completo el virus de sarampión, debido a que para lograrlo se requieren coberturas de vacunación mayores al 95% con una vacuna 100% efectiva (154). Convencionalmente la eficacia de la vacuna se evalúa por medio del porcentaje de seroconversión. La tasa de seroconversión requerida para prevenir brotes en una población es $\geq 95\%$ (155). En general las vacunas con virus vivos atenuados del VS confieren una seroconversión $>85\%$ (156, 157). Algunos estudios señalan que niños nacidos de mujeres con una inmunidad inducida por vacunación se vuelven más susceptibles a padecer sarampión a una edad más temprana que aquellos

nacidos de mujeres que hayan padecido la enfermedad (158).

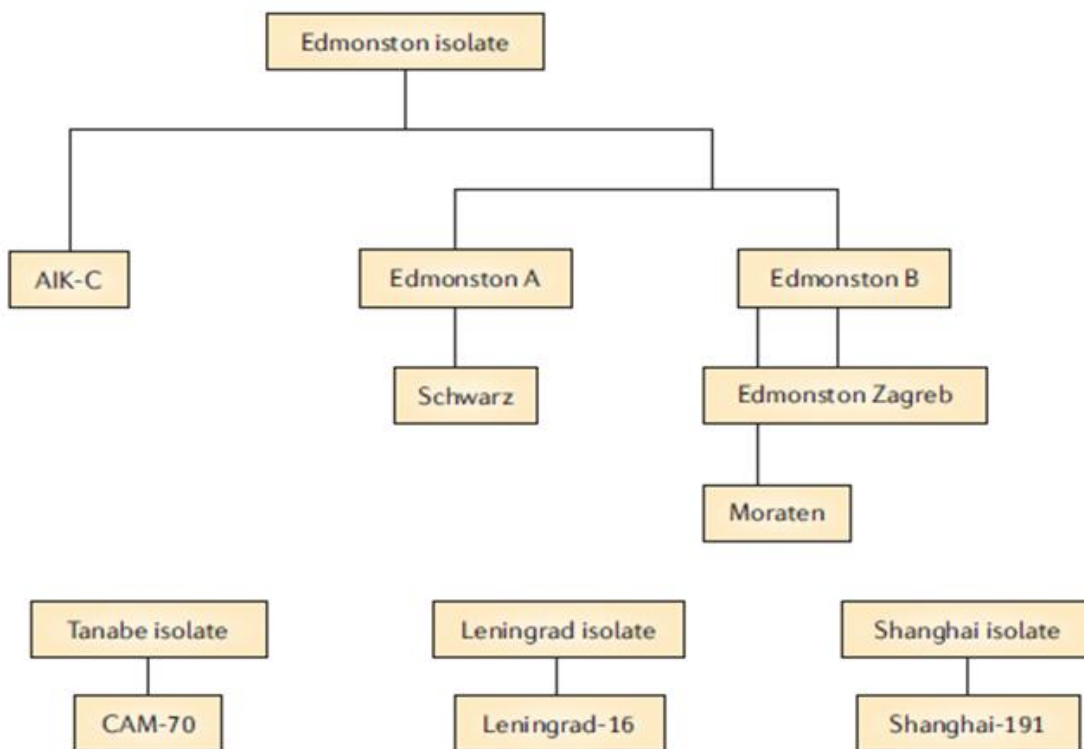


Figura 6. Cepas vacunales generadas a partir del primer aislado de VS del paciente Edmonston

10. Regulación de las vías de señalización y producción del interferón por la proteína C

En la infección por el VS las proteínas V y C están relacionadas a la modulación de la respuesta inmune innata del hospedero, particularmente en la regulación del IFN-1 (Fig.7) (159, 160).

La proteína C del VS juega un papel muy importante en el ciclo de generación de nuevos viriones. Posterior a la infección se le ha atribuido que participa importantemente en el ensamblaje del virus (161). Sin embargo, la gran mayoría

de los trabajos que describen sus funciones la relacionan con la regulación de las vías de señalización y producción de interferón. Diversos trabajos han mostrado los efectos funcionales que se obtienen de sustituciones o mutaciones experimentales en la proteína C, esto mediante el empleo de virus recombinantes, sistemas de minigenoma o sistemas de expresión en células eucariotas (Tabla 1).

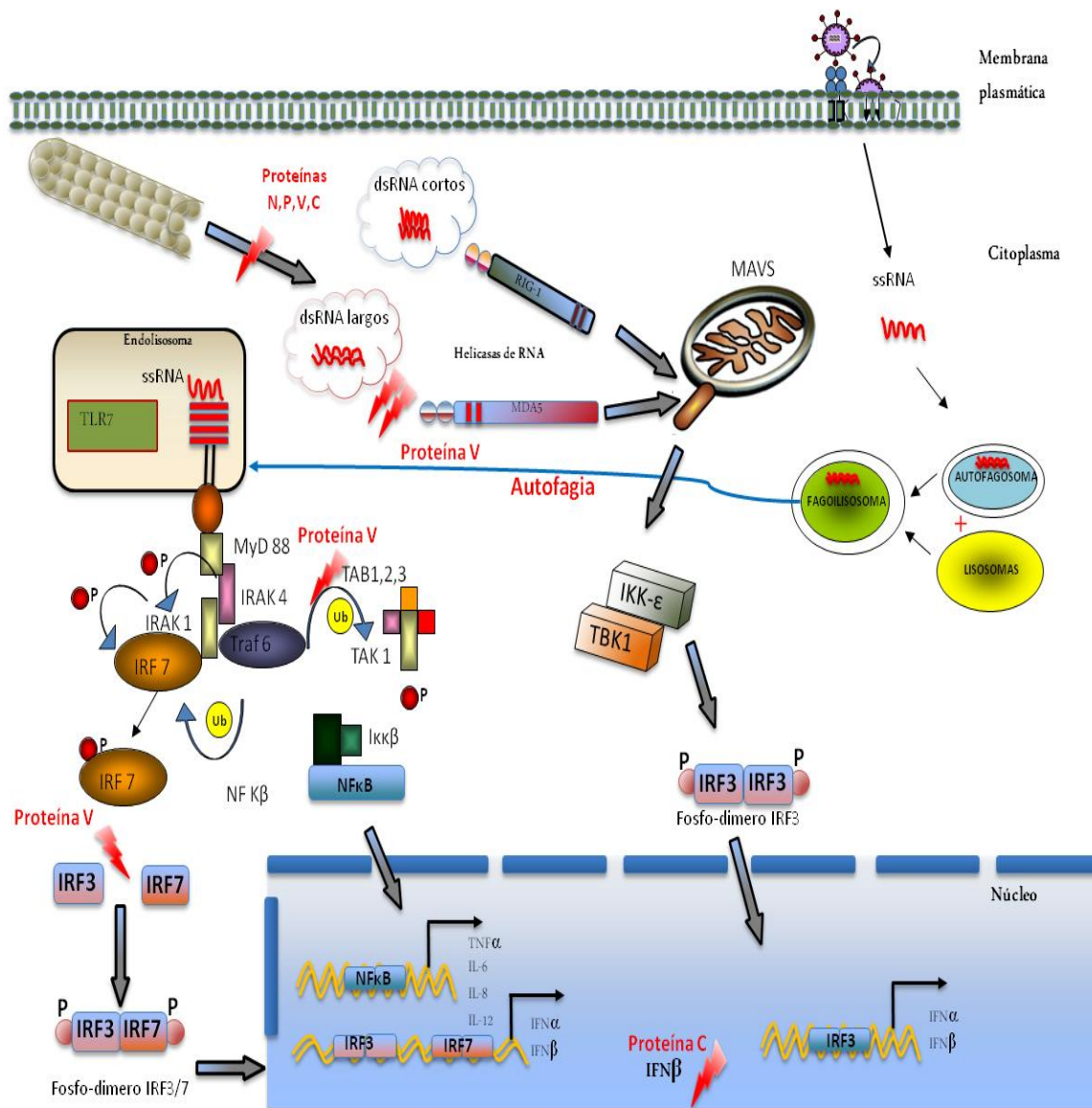


Figura 7. Rutas de inhibición del IFN-I por las proteínas no estructurales del VS.

Grupo	Nombre del virus	Mutación MLA C	Efectos funcionales de la mutación
GRUPO DE SARAMPION	Virus de Sarampión	Silenciamiento o exclusión del MLA C	Virulencia atenuada, falta de exantema, reducida eficiencia de replicación <i>in vivo</i> , inducción incrementada del IFN- β , inducción del arresto celular, activación de PKR e IRF1 a través de la acumulación de dsRNA viral
		R44G	Erradica la localización nuclear
		R44G,I147T, S158 \rightarrow (STOP) (C157), S166P	Incrementan la transcripción y replicación del RNA viral
		R44G, S158 \rightarrow (STOP) (C157),	Reduce la inhibición del IFN- β e incrementa la activación del IRF3
		V102A ,K111M	Asociado con la replicación y virulencia de virus atenuados
		M104T	Asociado con las cepas vacúnales Moraten, Rubeovax, y Schwartz
		S134Y	Asociado con la sensibilidad a temperatura de virus vacúnales
	Δ 127-138 (delección)	Erradica la interacción con SHCBP1, reduciendo su habilidad de inhibir la replicación del mini genoma y reduce los títulos virales	

MLA: Marco de Lectura Abierto.

Tabla1. Análisis de la función de los efectos funcionales de la proteína C del VS.

La proteína C es necesaria para contrarrestar la transcripción del IFN- β . Esta proteína se ha localizado por inmunofluorescencia en el núcleo y en inclusiones citoplasmáticas en células infectadas (8). Utilizando microscopia confocal y tinciones indirectas inmunofluorescentes se ha demostrado que la proteína C colocaliza con otras proteínas virales (N, P, y L) del complejo RNP (8). Sin embargo, estudios previos empleando un sistema de dos híbridos y ensayos de pull-down con glutatión transferasa (GST) no pudieron demostrar que la proteína C

interaccionara directamente con las proteínas de este complejo (162).

El mecanismo exacto que lleva a cabo la proteína C del VS para regular la transcripción del IFN no se conoce totalmente: esta proteína de 186 aa tiene la capacidad de entrar y salir del núcleo celular, debido a que posee secuencias de localización (NLS) y de exportación (NES) (163) nuclear, debido a esto no se descarta que pueda modular la producción de interferón probablemente interactuando con proteínas hospederas tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. En este sentido Ito M et.al. recientemente demostró que la Proteína C se une a la proteína 1 de unión al dominio SRC homólogo 2 (SHCBP1) en el citoplasma de la célula para regular la producción de IFN(164). El mecanismo por el cual lo hace es regulando indirectamente la transcripción de los mensajeros virales, en otras palabras, sirve como un regulador negativo que no permite que exista un incremento de los mARNs virales que puedan ser detectados por los PRRs y con esto inducir la producción de IFN. Por otro lado, dos estudios por separado, mostraron que la proteína C regula el IFN- β . McAllister et. al., demostró que la proteína C es un potente antagonista de la inducción de IFN β debido a que disminuye la señalización de forma dependiente e independiente de PKR (ATF-2 y NF κ B) y del factor regulador de interferón (IRF-3), respectivamente (165). Por otro lado Sparrer et. al. mostró que la proteína C actúa como un inhibidor viral de la transcripción del IFN- β . Sin embargo, en lo resultados se demostró que la activación del IRF-3 no se afecta por la presencia de la proteína C, sugiriendo un blanco nuclear (166).

El hecho que la proteína C tenga la capacidad de entrar y salir del núcleo celular permite pensar que ésta proteína pueda unirse a componentes celulares en el citoplasma de la célula hospedera que permitan alterar y/o regular ciertos aspectos nucleares que deriven en la regulación del IFN. Otra posibilidad es que la proteína C del VS pueda unirse a los dominios ricos de lisina y arginina presentes en el DNA y RNA celulares y así modular la respuesta a IFN y con ello pueda inhibir la respuesta antiviral contra el VS.

Hasta este momento, el mecanismo exacto por el cual la proteína C inhibe la transcripción del IFN- β desde el núcleo celular se desconoce.

11. Planteamiento del Problema

Los mecanismos que utiliza el VS para llevar a cabo una inmunosupresión son diversos, entre ellos se encuentran los ejercidos por sus proteínas no estructurales como V y C, las cuales pueden regular la producción de interferón tipo I, citocinas importantes para la generación de una respuesta inmune de larga duración. Los procesos de atenuación de un virus de sarampión silvestre a vacunal (virus vivo atenuado), por medio de pases en cultivo celulares, ejercen mutaciones puntuales al “azar” particularmente en el gen P/V/C. Diversas mutaciones en las proteínas V y C se ha observado que modifican sus funciones. Por tanto, conocer de que manera estas mutaciones afectan la capacidad de las proteínas virales de regular el desarrollo de la respuesta inmune, facilitaría el entendimiento de que mutaciones son importantes con miras a producir una vacuna más efectiva que permita la erradicación del VS.

12. Pregunta de Investigación

¿Cuál será la función de la proteína C del Virus de Sarampión en la regulación del interferón tipo-1 desde el núcleo de la célula hospedera?

13. Justificación

El sarampión es una enfermedad infecciosa causada por el virus de sarampión, es responsable de 158,000 muertes anuales (2011) alrededor del mundo, particularmente en países en desarrollo. Constituye el 5% de la mortalidad global de todas las causas en niños menores de 5 años de edad, lo que representa entre

el 45-50% de muertes de todas las enfermedades prevenibles por vacunación, a pesar de que existe una vacuna efectiva. El virus de sarampión causa una inmunosupresión transitoria que puede durar entre una semana y hasta 3 años, la cual facilita infecciones secundarias asociadas.

14. Hipótesis

Si la proteína C del VS es capaz de ingresar al núcleo celular, entonces es probable que pueda regular la transcripción del IFN beta.

15. Objetivos

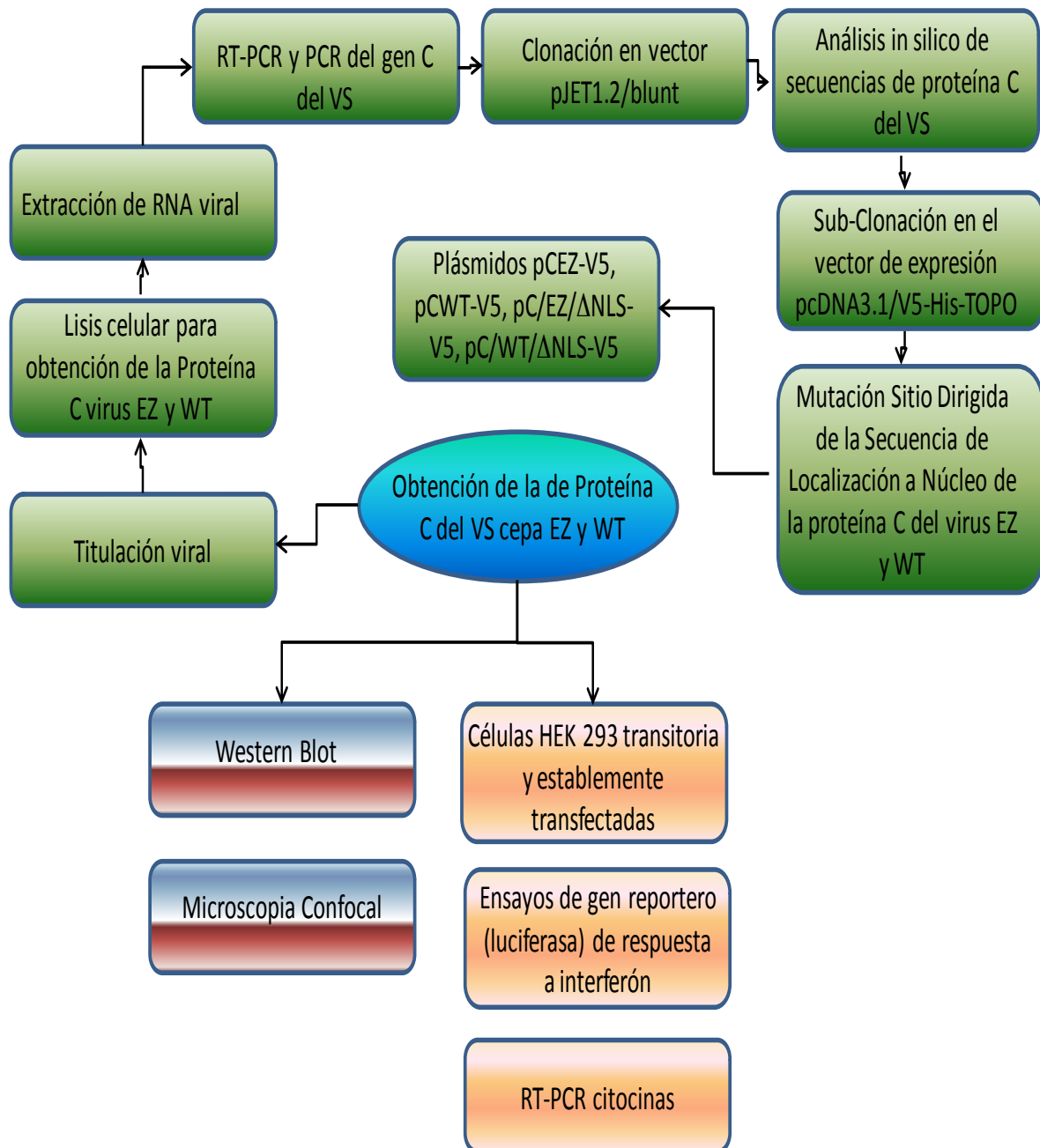
15.1 Objetivo General

Evaluar el papel de la proteína C de los virus Edmonston-Zagreb y Silvestre de sarampión en la regulación de la respuesta inmune innata

15.2 Objetivos Particulares

- Evaluar mediante secuenciación las mutaciones presentes en el marco de lectura de la proteína C del virus vacunal E-Z comparado con el virus silvestre de sarampión.
- Clonar, secuenciar y evaluar la expresión de la proteína C de los virus vacunal E-Z y silvestre de sarampión.
- Evaluar la regulación *in vitro* de citocinas de la respuesta inmune innata por la proteína C de los virus EZ y silvestre de sarampión.

16. Estrategia Experimental



17. Materiales y Métodos

17.1. Líneas celulares: células HEK293 y A549, fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC). Las líneas celulares se propagaron en botellas de cultivo de 75cm² (Corning) con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1x de L-glutamina y penicilina/estreptomicina (Invitrogen).

17.2. Virus y Título Viral

El virus Silvestre de Sarampión (VS_{WT}) es un aislado clínico en México en el año 2004 (Mv/Mexico.MEX/04, genotipo H1/1x10³ TCID₅₀), fue donado por el Laboratorio de Enfermedades Febriles y Exantemáticas del Instituto de Diagnostico y Referencia epidemiológica (InDRE). El virus vacunal de sarampión cepa Edmonston-Zagreb (VS_{EZ}) (Virus vivos atenuados/1x10³ TCID₅₀) fue provisto por el Instituto de Suero de la India. El virus Sendai (VR-907) se adquirió de ATCC.

El título viral se determinó usando un ensayo de neutralización en placa con células Vero (VS_{EZ}) y células B95a (VS_{WT}). Brevemente, en una placa de 24 pozos se transfirieron 150 µl de diferentes diluciones de los virus (10¹-10⁵) más 150 µl de RPMI-1640 con 2% de Suero Fetal Bovino (SFB). Se agregaron 100 µl de una suspensión celular a una concentración de 2x10⁵ células/mL en cada pozo. Se colocaron en una incubadora a 37 °C con 5% CO₂ por 2 horas, para permitir la absorción del virus, se lavó la monocapa 3 veces con 500µl de PBS1x y se agregó medio RPMI-1640 (1mL) con 3.8% de carboximetilcelulosa, pH7.2 (MM/Medio de

mantenimiento), se incubó a 37 °C por 3-5 días hasta observar efecto citopático. Finalmente se agregaron 250µL de una solución de paraformaldehído (4%) y cristal violeta (0.2%) a cada uno de los pozos por 20-30 minutos. La placa se lavó al chorro de agua sin que cayera directamente sobre las células. Se contaron las Unidades Formadoras de Placa (UFP) y se calculó el título viral usando la fórmula: $UFP \times mL = p \times 20 \times 10x$. Para determinar el título del virus Sendai (SeV): se preparó un concentrado de 1mL de antibióticos con 10,000 UI de penicillina G, 2,000 µg de estreptomicina, 1,000 µg de gentamicina y 20 µg de anfotericina B por mL, se tomaron 500µl del stock y se mezclaron con 49.5mL de PBS 1x (solución de trabajo antibióticos/STA). Se inocularon en cavidad alantoidea, 10 embriones de pollo de 7-9 días con 100µl del virus más 100µl de la STA utilizando una aguja calibre 23 y se utilizó PBS 1x como control negativo. Se mantuvieron en una incubadora a 37°C por 3 días, se colectó el líquido alantoideo y se realizó una prueba de hemaglutinación con eritrocitos de pavo al 1%. El título obtenido fue de 1:8,192 Unidades hemaglutinantes.

17.3. Material genómico

A partir de una monocapa de células Vero (1×10^5 /mL) infectadas con el VS_{EZ} y células mononucleares de sangre periférica (1×10^5 /mL) infectadas con el VS_{WT} por 3 y 10 días respectivamente, a una multiplicidad de infección (MOI) de 1, se obtuvo el RNA viral utilizando el kit RNAeasy (Qiagen) según el protocolo del fabricante. A partir del RNA se realizó cDNA mediante la técnica de transcripción reversa RT-PCR (RT-AccuScript High Fidelity PCR System/Agilent Kit). Para

obtener la secuencia completa del gen P, se utilizó el vector de clonación pJET1.2/blunt/PCR cloning vector cloning kit (Fermentas) con los siguientes primers, para el gen P (P-Fwd: GCA GCG GTC GAC TCA TGG CAG AAG AGG AGC, P-Rev: GCA GCA ACT GCT GTC GAC TGC TCA TCT TTA TTA ATT), gen V (V-Fwd: ATA AGC ATG GCT CAG GCA GAA GAG G, V-Rev: CGC GGC TGC TGG GAT TTA TTC CTC), y el gen C (C-Fwd: ATA GAA TTC GCC ACC ATG ACA GAC GC, C-Rev: ATA CTC GAG CTA CTT TAT TAT CAT CTT).

17.4. Secuenciación de las proteínas V y C del VS

Se utilizaron como templado los productos de PCR previamente clonados en el vector pJET1.2/blunt con primers específicos, utilizando una reacción con polimerasa de alta fidelidad (Phusion/High Fidelity DNA Polymerase/Fermentas), se corrió un gel de agarosa al 0.8% y se purificaron las bandas utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Los productos purificados de PCR se prepararon con el Kit de ABI Prism Sequencing Kit (Applied Biosystems). Se analizaron las mutaciones presentes en los marcos de lectura de los genes de las proteínas V y C con ABI Prism 3100 (Perkin Elmer). Se compararon las secuencias obtenidas contra secuencias conocidas de los genomas de virus de sarampión previamente depositadas en el Genbank (AF266290.2), mediante el uso del programa DNASTAR/Lasergene.

17.5. Vectores de Expresión

Se utilizó el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) para la secuenciación del DNA y expresión de las proteínas virales en células eucariotas. En el vector se clonaron las secuencias de los Genes P, V y C del VS_{EZ} y el VS_{WT}. La secuencias de las proteínas V y C se clonaron utilizando los primers (C-V5-Fwd: ATG TGG GAC TCA AAT AAA ACG GC, C -V5-Rwd: GGA GGA CGT GCT CCC TCT CTC CTT C), (V-V5-Fwd: ATG GCA GCA CAG GAG GAA CGC, V-V5-Rwd: TTC TGG ATT GAT CTC GAG GGG GTG G). Brevemente, para ligar los productos de PCR con el vector pCDNA3.1/V5-His se empleó 1µl de ligasa T4 (Fermentas). Posteriormente se transformaron 50µl de células competentes *E. coli* DH5α, se plaquearon en cajas con medio Luria Bertani (LB) con una concentración de ampicilina de 100µg/ml, Se realizó un análisis de posibles clonas mediante PCR de colonia utilizando el GoTaq green Master Mix (Promega), empleando los primers forward T7 y reverse BGH del pCDNA3.1/V5-His. A partir de clonas crecidas se realizó un duplicado y se inocularon tubos con 3mL de medio LB con ampicilina a 100µg/ml, se incubaron a 37°C en agitación constante a 200rpm por 18 horas. Se extrajo el plásmido mediante el kit QIAprep Mini Spin Kit (QIAGEN) y se restringió con 1µl de las enzimas FastDigest HindIII/EcoRV (Fermentas), se corrió un gel de agarosa al 0.8% para corroborar la existencia del plásmido y las secuencias de tamaño correcto en pares de bases esperadas. Los plásmidos analizados por restricción enzimática se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

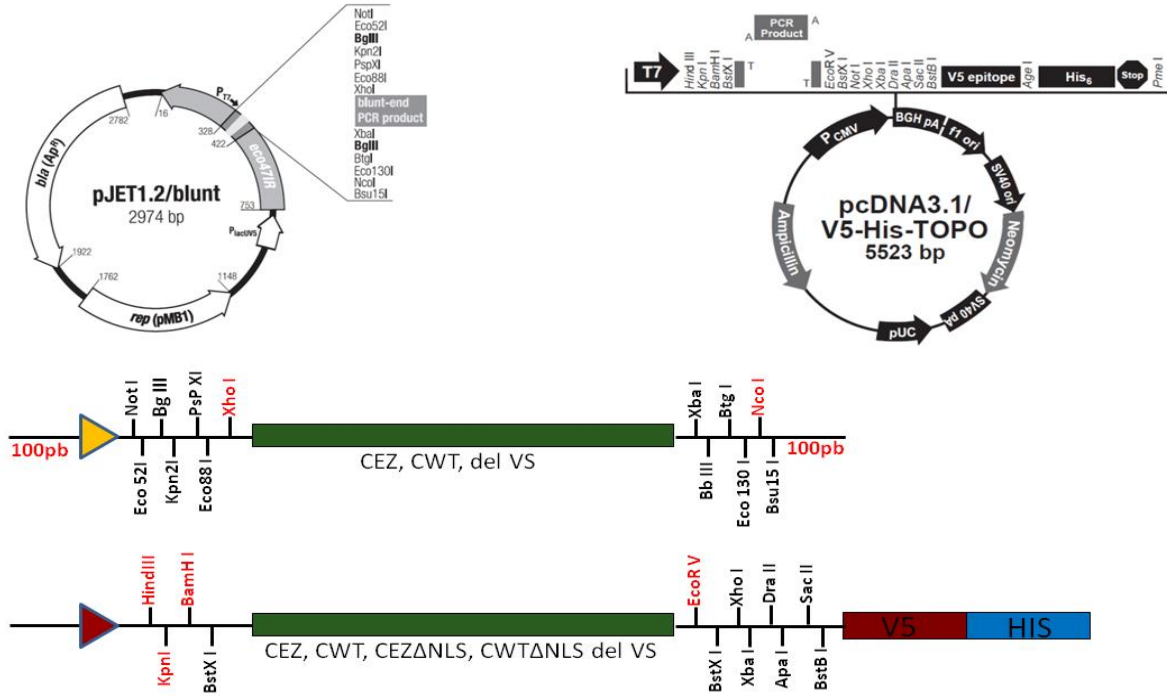


Figura 8. Esquema de los vectores pJET1.2/blunt y pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Sitios de restricción utilizados para clonar la secuencia de la Proteína C de los virus EZ y WT.

17.6. Ensayo de Mutagénesis Sitio Dirigida

Para obtener la proteína V del VS se llevó a cabo la inserción de una Guanina en la posición 692 de aa, con la finalidad de correr el marco de lectura y generar la región carboxilo terminal específica de la proteína V. Para el caso de los dos virus se utilizaron los siguientes primers: (MSD-V-EZ/WT Fwd: ACA CCC ATT AAA AAG GGG CAC AGA CGC GAG ATT AG). Por otro lado, para generar la delección de la secuencia de localización a núcleo del VS se utilizaron los primers: (MSD-NLS-CEZWT Fwd: CGA GCC ACC TGC ACA GGC AGT TCG GG, MSD-NLS-CEZWT Rwd: CCC GAA CTG CCT GTG CAG GTG GCT CG, para ambos casos se empleó, según indicaciones del fabricante, el kit de mutagénesis sitio dirigida (QuikChange Lightning Multi-Site Directed Mutagenesis Kit/Agilent). Los plásmidos

obtenidos de la MSD se enviaron a secuenciar al IBT y se observó que la NLS ($\Delta 44-47$), de la proteína C del VEZ y VWT había sido mutada.

17.7. Células Hek 293 establemente transfectadas

La generación de células 293 establemente transfectadas con las proteínas C o C- Δ NLS de ambos virus se llevó a cabo utilizando 1×10^6 células 293 en placas de 6 pozos, transfectadas con $5 \mu\text{g}$ de los plásmidos pV5-C, pV5-C- Δ NLS de los $V_{S_{EZ}}$ y $V_{S_{WT}}$, usando $7 \mu\text{l}$ de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Cada dos días se reemplazó el medio RPMI-1640 que contenía $500 \mu\text{g/ml}$ de Geneticina-418 (Gibco) por 6 semanas.

17.8. Ensayos de Luciferasa con el gen reportero de Interferón

Las células Hek 293 se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 70% en placas de 24 pozos, se transfectaron usando medio optimem y lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. El plásmido pLuc-125 (donado amablemente por Takashi Fujita, Kyoto, Japon) y el plásmido pRL Renilla (Promega) fueron co-transfectados con los plásmidos C_{EZ} , C_{WT} , $C_{EZ/\Delta NLS}$, $C_{WT/\Delta NLS}$, y V_{WT} clonados en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. A partir del plásmido EGFP-C1 (Promega) se obtuvo la proteína verde fluorescente con los primers: (nGFPC Fwd: ATA GAA TTC ATG TCA AAA ACG GAC TGG AAT GC, nGFPC Rwd: ATA GGA TCC GGA GCT CGT GGA TCT CCC CTC CTT CTG), se clonó en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO (GFP-V5), este plásmido se utilizó como control negativo no relacionado a la inhibición de la transcripción de

interferón, el pcDNA3.1/V5-His-TOPO vacío se empleó para demostrar los niveles basales de luciferasa. Como control positivo, de la inhibición de interferón, se clonó la proteína V del VS_{WT} obtenida por MSD en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO (V_{WT}) con los siguientes primers: (V5V Fwd: ATG GCA GAA GAG CAG GCA CGC, V5V Rwd: TTC TGG GAT CTC GGG GAG ATT GTG G). Las células HEK 293 transfectadas por 6 horas con los diferentes plásmidos con secuencias codificantes, fueron posteriormente estimuladas por 18 horas con 100µl de una dilución 1:100 del virus Sendai. Finalizada la incubación, se lisaron las células, de acuerdo al protocolo del fabricante se emplearon los sobrenadantes y se midió la actividad de Luciferasa con el kit Dual Reporter Luciferase System (Promega). La quimioluminiscencia se cuantificó utilizando el equipo Luminoskan Ascent FL microplate luminometer (Thermo Electron). La eficiencia de transfección fue expresada como la relación de la luminiscencia de Renila/Luciferasa de células transfectadas y estimuladas con el virus Sendai, así como los controles GFP-V5, V_{WT} y el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO vacío.

17.9. Western blot

Las células HEK293 (3×10^4 células/mL en placas de 6 pozos colocadas un día previo) y transfectadas con los plásmidos C_{EZ}, C_{WT}, C_{EZ}/ΔNLS y C_{WT}/ΔNLS, se lavaron con PBS 1x frío y se homogeneizaron con un buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) en presencia de 10µl/mL de un coctel de inhibidor de proteasas (Roche). En algunos experimentos las proteínas del citoplasma y núcleo fueron separadas

empleando el kit (NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents/Pierce) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La concentración de proteínas fue determinada utilizando Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). Brevemente, se realizaron 5 diluciones a partir de un estándar de proteínas-BSA en un rango de 0.6 a 10 mg/ml. Los ensayos se realizaron por duplicado. Agregamos 150 μ l del reactivo de tinción en cada pozo e incubamos por 15 minutos a temperatura ambiente, la absorbancia se midió a 620nm en el equipo Multiskan FC (ThermoScientific). Los homogeneizados (30 μ g por carril) fueron separados por electroforesis bajo condiciones reductoras en un gel de gradiente Tris-Glicina 4–12% (NuPage, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de polivinilo de flúor (PVDF) a 30 V; 40 min. Posterior a la transferencia, la membrana se bloquea utilizando 5ml de TBS-Tween 20 0.05% que contenga 5% BSA (Sigma) a 4 °C; toda la noche en agitación constante, La membrana se lava 3 veces con TBS-Tween 20 al 0.1%, posteriormente se incubaba con el anticuerpo monoclonal Anti-V5-HRP (Invitrogen/R961-25) a temperatura ambiente por 1 hr. Nuevamente se lava la membrana 3 veces y se agregan 600 μ l del sustrato quimioluminiscente (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, 34095, Pierce Protein Research Products, Thermo Scientific, Rockford, IL). El análisis densitométrico se llevó a cabo con el programa Quantity-One versión 2.3 (Bio-Rad Laboratories).

17.10. Microscopia Confocal

Las células HEK 293 (5×10^5) se crecieron sobre cubreobjetos en placas de 24 pozos por 24 hrs, posteriormente fueron transfectadas con 500ng de los plásmidos C_{EZ} , C_{WT} , $C_{EZ}/\Delta NLS$ y $C_{WT}/\Delta NLS$ por 6 hrs, utilizando Lipofectamina 2000 según especificaciones del fabricante. Las preparaciones fueron tratadas con el anticuerpo monoclonal anti-V5-FITC (dil 1:200) (Invitrogen/R963-25), para la tinción nuclear se empleó el reactivo HOESCHT Dil 1:10,000 (Invitrogen/33258), todas las preparaciones fueron fijadas con una solución al 2% de paraformaldehído en PBS (BD Bioscience). Se emplearon 2 μ l of Vectashield (Vector) para montar sobre un portaobjetos y fueron sellados con barniz de uñas. Las preparaciones se observaron con el microscopio confocal Leica TCS SP5, 60xdrylens. Las imágenes fueron analizadas con el software LAS AF (Leica Microsystems).

17.11. Ensayos de RT-PCR Cuantitativa

Se obtuvieron células HEK 293 y A549 tratadas como en los ensayos de luciferasa con ciertas diferencias. Terminado el tiempo de transfección con los plásmidos C_{EZ} , C_{WT} , $C_{EZ}/\Delta NLS$, $C_{WT}/\Delta NLS$, y V_{WT} y estimulados con el SeV. Las células se cosecharon en buffer RLT y se obtuvo el RNA completo utilizando el kit de extracción Qiagen RNeasy, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA fue digerido usando una DNasa-I libre de RNasa por 45 min a 37°C. Posterior a la inactivación, la DNasa se trato con EDTA (Fermentas) a 65°C por 10 min, se alinearon oligos (dT) a 65°C por 10 min. La transcripción reversa se llevó a cabo a

55°C por 30min (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit). El cDNA se analizó por PCR en tiempo real con el kit Kapa SYBR Fast qPCR utilizando el equipo StepOne (Applied Biosystem), los resultados se analizaron con el software StepOne v2.1. Los primers empleados para el IFN-β humano fueron: FWD: TCC AAA TTG CTC TCC TGT TG; RWD: GCA GTA TTC AAG CCT CCC AT, IL-6 humano, FWD: GAC CCA ACC ACA AAT GCC A; RWD: GTC ATG TCC TGC AGC CAC TG, IL-10 humano, FWD: GGT GAT GCC CCA AGC TGA; RWD: TCC CCC AGG GAG TTC ACA, GAPDH, FWD: TGG TAT CGT GGA AGG ACT CA; RWD: CCA GTA GAG GCA GGG ATG AT. Los valores de la cuantificación relativa de 2 pruebas por duplicado, se calcularon dividiendo los valores del IFN, IL-6 e IL-10 y entre los valores de GAPDH. Los resultados obtenidos, en unidades arbitrarias, fueron recalculados tomando el valor de media de inducción de las citocinas por la inducción del control y se llevaron al valor de 1, tomando en cuenta este como el 100%. Las barras en las figuras muestran las medias de los valores por duplicado y se muestra la desviación estándar.

18. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó U de Mann Whitney, utilizando el programa GraphPad Prism V 6.0 (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA, USA). Los datos fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de $p \leq 0.05$.

19. Resultados

19.1. Mutaciones presentes en el gen V y C entre las cepas EZ y silvestre de Sarampión.

Para poder identificar las mutaciones presentes en las proteínas C y V entre la cepa vacunal EZ y silvestre de Sarampión. Infectamos 5×10^6 mononucleares de sangre periférica a una MOI de 10 con cada uno de los virus, se incubaron a 37°C por 72 hrs y 10 días respectivamente. Se extrajo el ARN total y a partir de éste se realizó la síntesis del cDNA. Utilizando oligos dt/18 (Thermo Scientific) y primers específicos para las secuencias de las proteínas virales se llevó a cabo la síntesis de cDNA específico de secuencia. Estas secuencias se clonaron en el vector pJET (Fermentas) y se enviaron a secuenciar. La secuencia de aminoácidos de las proteínas V y C presentó 26 y 9 cambios respectivamente. Las secuencias fueron comparadas en el GenBank con el genoma del virus de Sarampión (AF266290.2). La comparación de las secuencias de aminoácidos entre las proteínas V y C de los virus está representada en la Tabla 2.

Para determinar la localización sub-celular de la proteína C, transfectamos 1×10^6 células 293 con las construcciones VSC_{EZ} (C_{EZ}) y VSC_{WT-H1}(C_{WT}), analizamos la presencia de la proteína por microscopia confocal 24 y 48 hrs postransfección (pt). Veinticuatro horas pt de la proteína C_{EZ}, se observó una expresión tanto en el citoplasma como en el núcleo celular a las 24 y 48 hrs a diferencia de la proteína C_{WT} que se observó exclusivamente en el núcleo a las 24 hrs, posteriormente a las 48 hrs también se observó en el citoplasma (Fig 10B). Estos resultados muestran que existen ciertas diferencias entre las secuencias de estas proteínas que permiten una expresión sub-celular diferencial. El hecho que la proteína C_{WT} se encuentre (probablemente en tiempo más tempranos), en las primeras 24 hrs postransfección exclusivamente en el núcleo celular, a diferencia de la proteína C_{EZ}, sugiere inicialmente que ambas cuentan con señales de localización y exportación nuclear. Sin embargo, ciertas diferencias específicamente en esta secuencia probablemente expliquen la expresión sub-celular diferencial. Por otro lado, se ha descrito, que ante una infección por el virus de sarampión *in-vitro*, la producción de interferón se lleva a cabo dentro de las primeras horas post-infección y que las cepas silvestres de sarampión poseen una mayor capacidad de regularlo. El hecho que la proteína C_{WT} permanezca más tiempo dentro en el núcleo probablemente explique su mayor capacidad de regular el interferón en comparación con la C_{EZ}.

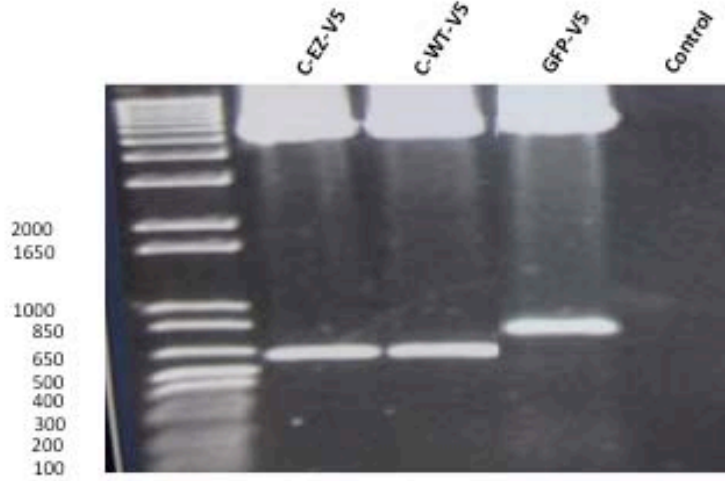
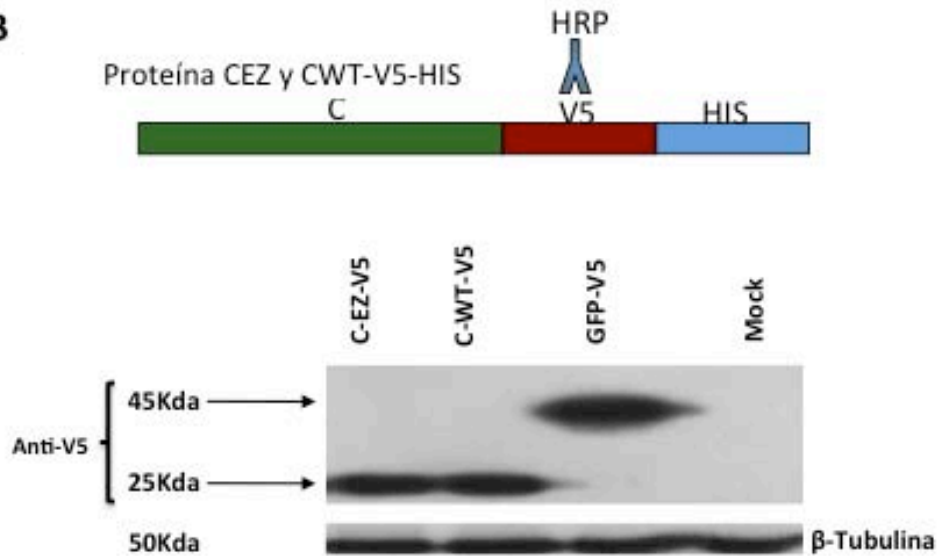
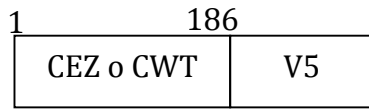
A**B**

Figura 9. Expresión de la proteína C del VS en células HEK293. Ensayos de A) PCR y B) Western Blot C_{EZ} and C_{WT} a 24 horas postransfección en células Hek 293, utilizando el anticuerpo anti-V5 primario (HRP) dil 1:5,000.

A) Proteínas C_{EZ} y C_{WT} en el vector pCDNA3.1/V5-His-TOPO



B)

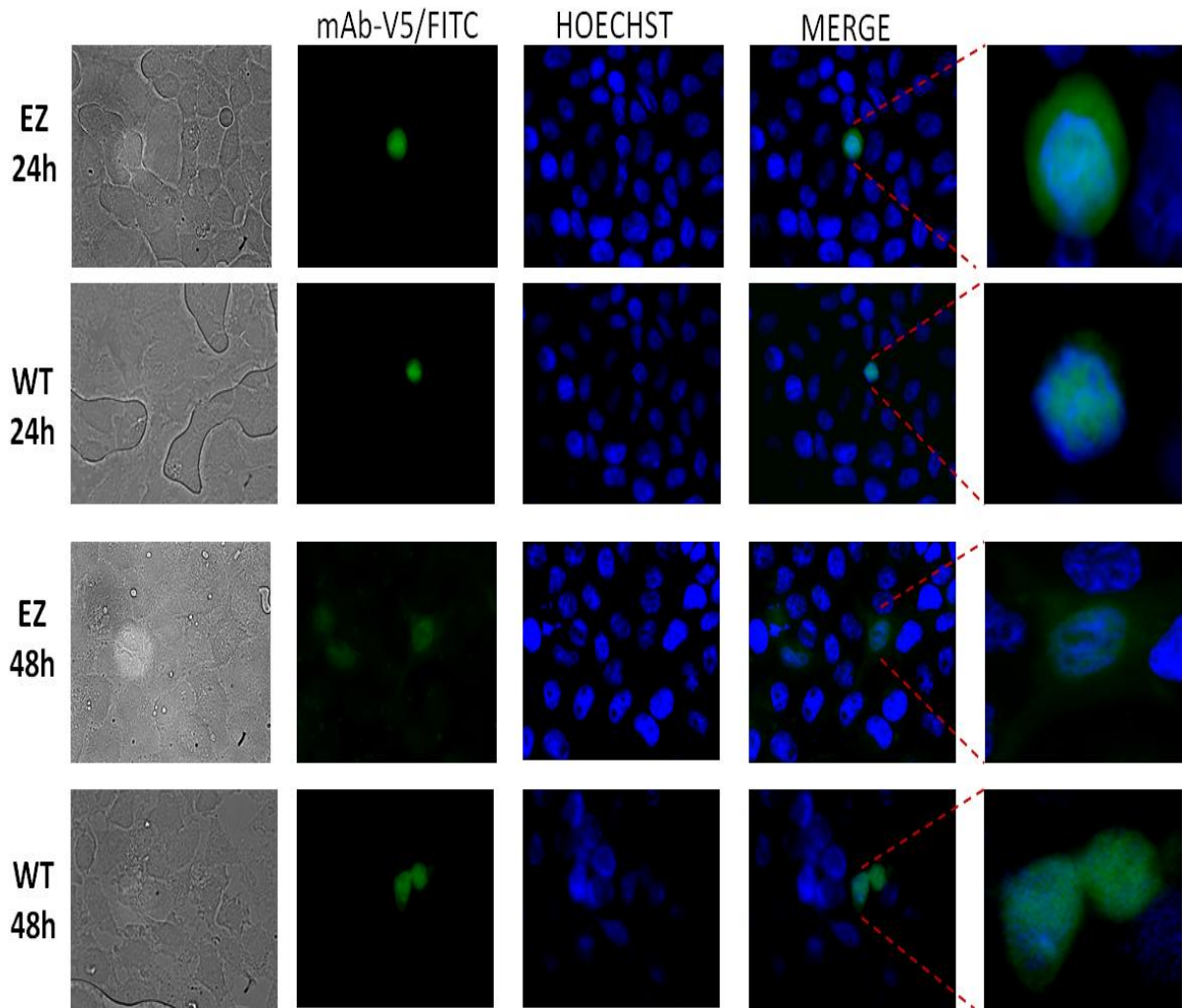


Figura 10. Acumulación nuclear de la proteína C_{WT} -V5 a partir de cDNA transfectado en células 293. A) Diagrama esquemático de las proteínas C fusionada en el vector V5. **B)** Edmonston-Zagreb y C) Virus Silvestre de Sarampión a 24 y 48 horas postransfección, en células Hek 293 con las construcciones GFP, C_{EZ} and C_{WT} en el pV5, utilizando el anticuerpo anti-V5 (FITC) dil 1:200. El núcleo fue teñido con el colorante Hoescht dil 1:10,000 (Azul). Las células transfectadas se analizaron por la expresión de FITC usando microscopia confocal, Leica TCS SP5, 60x drylens.

19.3. La localización nuclear de la proteína C es dependiente de la NLS

En la infección por el VS, se ha descrito que la translocación citoplasma-núcleo de la proteína C, se lleva a cabo a través de los poros nucleares y se inicia por la interacción de algunas proteínas de la maquinaria de importación con secuencias específicas de la proteína C, llamadas señales de localización nuclear (NLS). La NLS de la proteína C_{WT} (41PPARKRRQ48) mostró motivos típicos tipo "pat7", compuesta por aminoácidos como prolina seguida de tres residuos básicos. Sin embargo, la NLS de la proteína CEZ (41PPAGKRRQ48) presenta una mutación en el aminoácido 44, cambiando el aa Arginina por Glicina (R44/G44). Recientemente esto se ha descrito que este es un marcador diferencial entre las cepas vacunales y silvestres de Sarampión(163), esto al igual que el cambio de aminoácido en la posición 481 (asparagina por tirosina) en la glicoproteína H del VS(167). La mutación R44 es el primer marcador común a todas las cepas vacunales de Sarampión. De acuerdo con estos datos, se introdujo por mutagénesis sitio dirigida una delección de cuatro aminoácidos en ambas secuencias (Δ G/R, K, R, R) en las NLS de C_{EZ} y C_{WT} (Δ 44-47), la secuenciación muestra una delección específica de estos 4 aminoácidos en ambas secuencias. Para determinar la localización sub-celular de la proteína C se analizaron mediante PCR las secuencias posterior a esta mutación (Fig. 11A). Utilizando a C_{EZ}/ Δ NLS y C_{WT}/ Δ NLS, y la NLS original de C_{EZ} y C_{WT} como controles, se transfectaron células 293 y se analizaron 24hrs pt por western blot (Fig. 11B) y microscopía confocal (Fig. 11C). Como se esperaba, cuando se emplearon las proteínas C_{EZ} y C_{WT} sin la mutación en la NLS, se comportaron como en la Figura

10B. Mientras que $C_{EZ}/\Delta NLS$ y $C_{WT}/\Delta NLS$ no tuvieron la capacidad de translocarse al núcleo y se acumularon en el citoplasma de las células, confirmado el papel de la NLS (Fig. 11B).

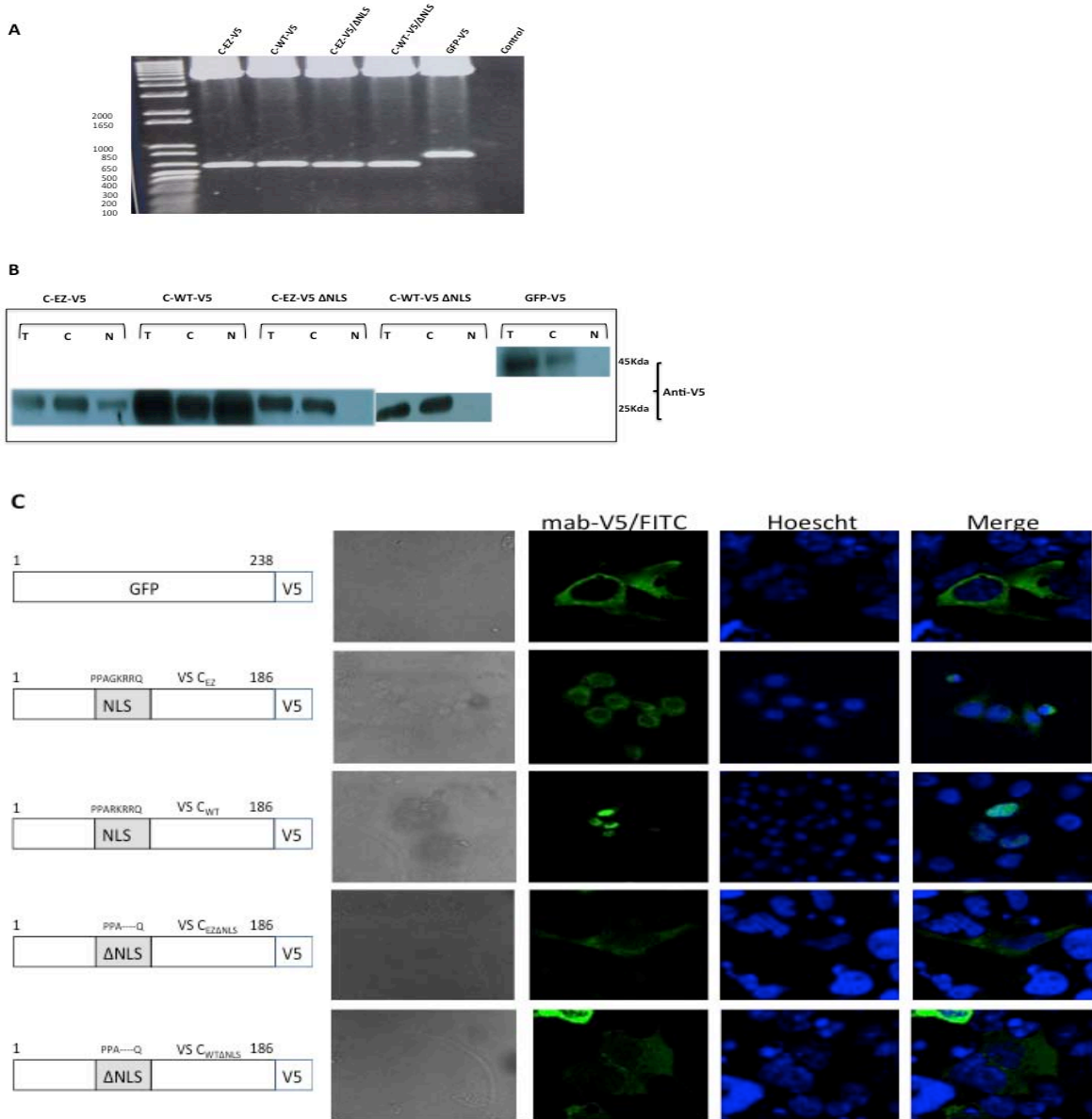


Figura 11. Localización subcelular de la proteína C del virus EZ y silvestre de sarampión con una mutación presente en la secuencia de localización nuclear (NLS). **A)** Secuencias y **B)** Western blot de las proteínas C del VS, con la secuencia de localización nuclear completa (NLS) y mutada (NLS Δ^{44-47}). **B)** Se transfectaron células Hek 293 con plásmidos que codifican para la proteína GFP y C mutante $C/\Delta NLS^{44-47}$ de los virus GFP, C_{EZ} and C_{WT} a 24 horas postransfección en células Hek 293, utilizando el anticuerpo anti-V5 (FITC) dil 1:200. El núcleo fue teñido con el colorante Hoescht dil 1:10,000 (Azul). Las células transfectadas se analizaron por la expresión de FITC usando microscopía confocal. Lisado total (T), Citoplasma (C), Núcleo (N).

19.4. La proteína C_{WT} inhibe la inducción del promotor de IFN

Estudios previos han reportado que las proteínas C y V tienen la capacidad de regular el IFN y que las habilidades de regulación de estas proteínas son diferentes entre cepas del VS(58, 88). Recientemente Konstantine et al. reportó que por sí sola la secuencia de la NLS de la proteína C_{WT} no está involucrada directamente en el mecanismo de inhibición del IFN, pero sí determina el grado de acumulación nuclear de la proteína, esto es, que una NLS funcional es crítica para retener la proteína C en el núcleo (168). Por otro lado, Shaffer et al. reportó que la proteína C juega un papel muy importante en la patogénesis del VS debido a que tiene la capacidad de inhibir la señalización del IFN(58). Nosotros analizamos la capacidad de las proteínas C y V del VS en la inducción del IFN. Para determinar esto utilizamos 5 construcciones (C_{EZ}, C_{WT}, C_{EZ}/ΔNLS, C_{WT}/ΔNLS, y V_{WT}) clonadas en el vector pCDNA3.1/V5-His-TOPO y llevamos a cabo ensayos duales de luciferasa empleando los plásmidos p125-luc (promotor de INF-β) y pRel en células 293. Mediante dos aproximaciones diferentes probamos si las proteínas C afectan la capacidad de la células de inducir el interferón. Inicialmente se transfectaron células 293 con tres diferentes concentraciones (100, 200 y 400 ng/μl) de nuestras construcciones y al mismo tiempo se co-transfectaron con el p125/pRel (300ng/μl) por 6 horas y posteriormente fueron estimuladas con el SeV (inductor de interferón) por 18 hrs extras (Fig. 12A), utilizamos como control positivo de inhibición de interferón la proteína V_{WT} y como control negativo la construcción GFP-V5. Para los ensayos de inhibición utilizamos células HEK293 transitoria (Fig. 13A) y establemente (Fig. 13B) transfectadas con nuestras 5

construcciones (400ng), se co-transfectaron con el p125/pRel 6 horas y se estimularon por 18 hrs con el SeV. Mientras la proteína C_{EZ} solo tuvo efectos marginales en la inhibición del promotor de IFN β , la expresión de C_{WT} y V_{WT} disminuyeron substancialmente la inducción del IFN β . Estos resultados muestran que la C_{WT} posee una mayor capacidad de inhibir la inducción del promotor de IFN β en ambas aproximaciones.

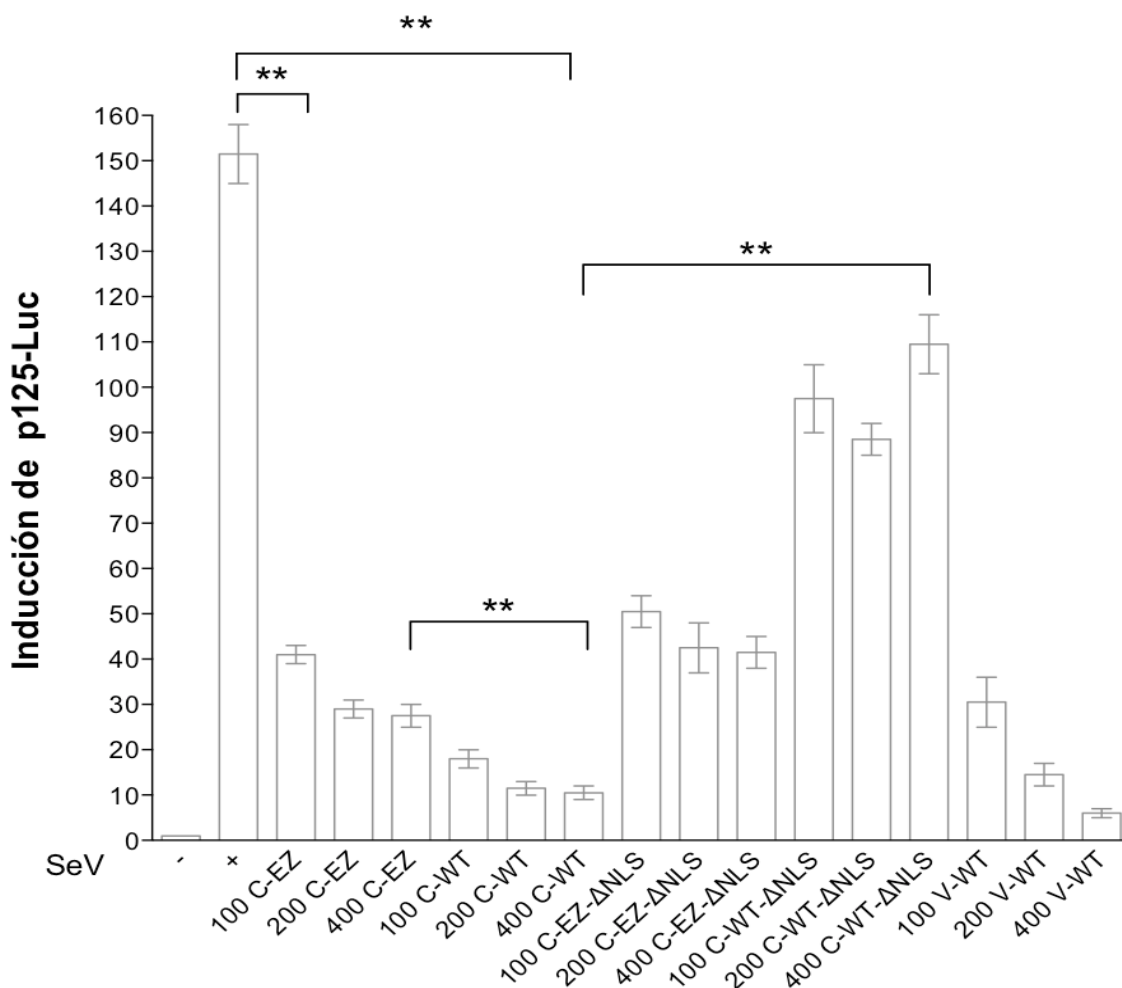


Figura 12. A) Empleo de diferentes concentraciones de las construcciones de la Proteína C del VS completa y deletada. Se utilizó la proteína V del VS como control positivo de inhibición. **p<0.001.

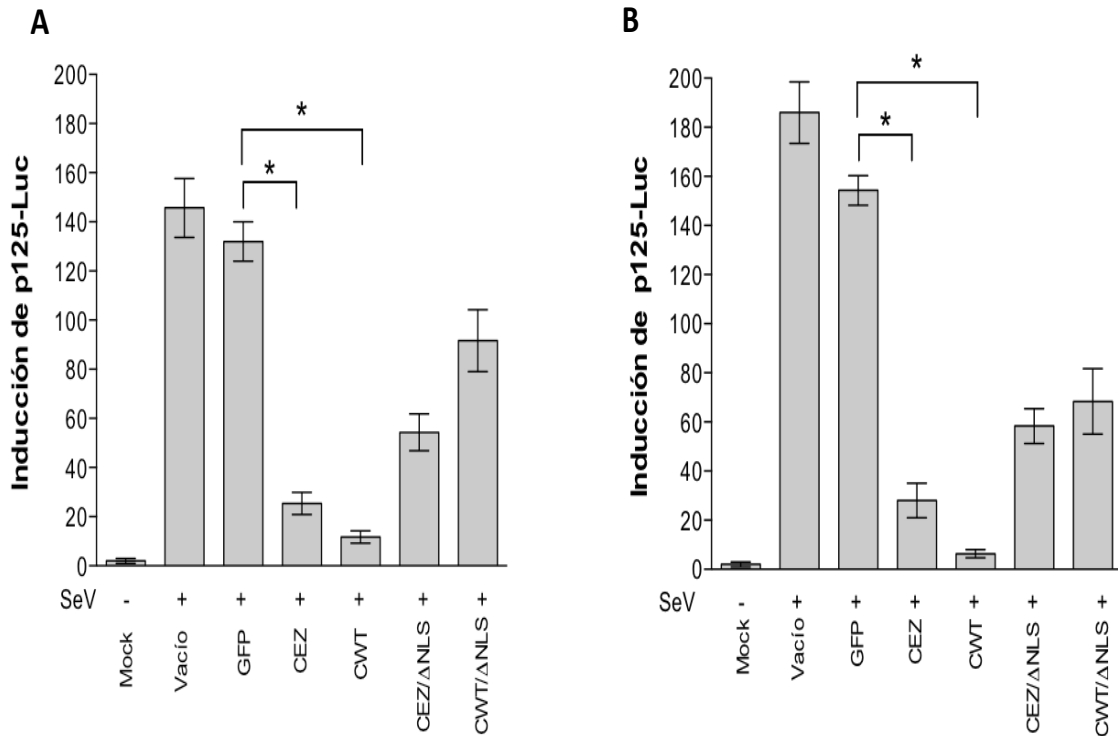


Figura 13. Inhibición de la actividad del IFN- β por la proteína C del Virus de Sarampión. Ensayos duales de luciferasa en células 293 **A)** transitoria o **B)** establemente transfectadas con los plásmidos que codifican para C_{EZ} , C_{WT} , $C_{EZ/\Delta NLS}$, $C_{WT/\Delta NLS}$ y GFP como control negativo por 6 hrs con el Virus Sendai. Los lisados fueron cosechados a las 18 hrs post-infección para los ensayos de luciferasa. * $p < 0.005$

19.5. La proteína C inhibe específicamente la inducción del IFN y no otras citocinas

Resultados previos de este trabajo han mostrado que la proteína C tiene la capacidad de regular la producción de IFN. Sin embargo, nos preguntamos si esta regulación es exclusiva de IFN o bien es capaz de regular otras citocinas. Para responder a esto, llevamos a cabo ensayos de PCR en tiempo real para IFN, IL-6 e IL-10, utilizando el gen de expresión constitutiva GAPDH, en dos líneas celulares Hek 293 y A549. Para ello se colocaron (5×10^5) células en pozos de placas de 24

pozos por 24hrs, posteriormente se transfectaron (lipofectamina 2000) los plásmidos C_{EZ} , C_{WT} , $C_{EZ/\Delta NLS}$, $C_{WT/\Delta NLS}$ y V_{WT} clonados en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. El plásmido GFP-V5 y el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO vacío se utilizaron como controles. Ambas líneas celulares se transfectaron con estos plásmidos durante 6 horas más un estímulo por 18 horas con el SeV. Finalizada la incubación, se lisaron las células, de acuerdo al protocolo del fabricante y se obtuvo el RNA, mediante transcripción reversa se obtuvo el cDNA para posteriormente analizarlo por tiempo real. Los resultados indican que la proteína C del VS es capaz de regular de forma específica el IFN y no así la IL-6 e IL-10 en las dos líneas celulares HEK 293 (Fig. 14A) y en las A549 (Fig. 14B).

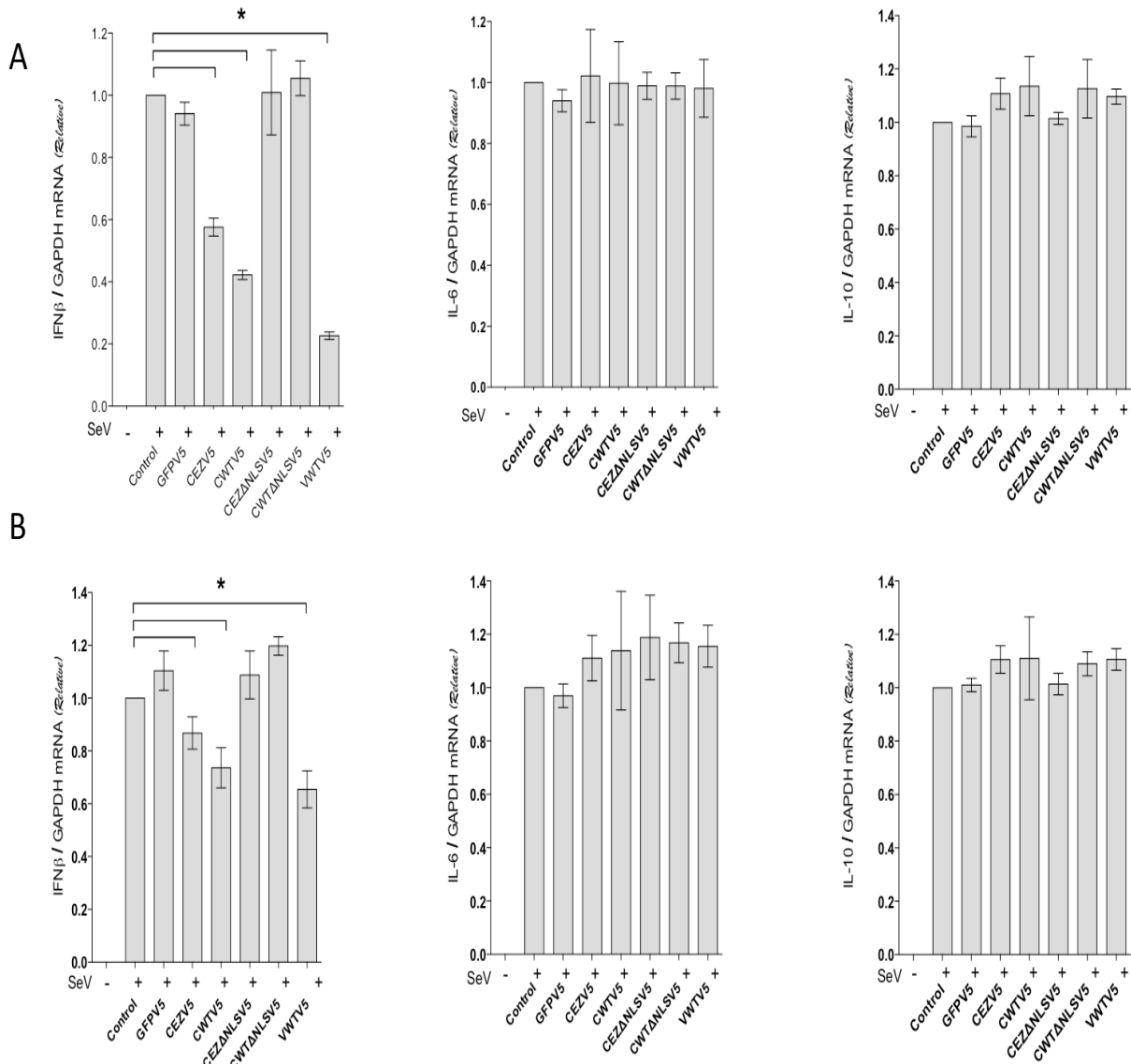


Figura 14 Ensayos de RT-PCR en tiempo real. Ensayos duales empleando plásmidos de Renilla-Luciferasa co-transfectados en células HEK293 y A549, estimulados con virus Sendai por 18 horas. Expresión transitoria (transfección de células con los plásmidos de la proteína C por 6 hrs) **(A)** o células establemente transfectadas y mantenidas con genética (G418) **(B)** con los plásmidos que codifican para CEZ, CWT, CEZ/ΔNLS, CWT/ΔNLS y GFP (control negativo). La proteína C del virus de sarampión inhibe específicamente el mRNA del **IFN-β**, pero no el mRNA de IL-6 e IL-10. Se utilizó la proteína V_{WT} como control positivo de inhibición de IFN-β. *p<0.05

20. Discusión

La primera publicación de secuencia de una cepa vacunal del VS fue publicada en 1993 (169). Hasta la fecha se han publicado diversos estudios comparativos de secuencias entre las cepas vacunales y silvestres del VS (170). En todos estos estudios se ha intentado asociar el número de cambios de aa entre las secuencias con el proceso de atenuación. Sin embargo, es importante entender que el número de mutaciones o un número muy elevado de pases en cultivos celulares no determinan necesariamente el fenómeno de atenuación, sino que probablemente sean cambios específicos en los genes implicados en la regulación del interferón los que de alguna forma podrían explicar el fenómeno de atenuación. Estos cambios podrían obedecer a un pequeño número de mutaciones específicas en las secuencias de estos genes. De acuerdo con esto, un estudio mostró el análisis comparativo de secuencia entre la cepa Ichinose B (IC-B) silvestre y la misma cepa posterior a su adaptación en células Vero, los resultados mostraron sólo dos mutaciones, una en el gen P/V/C y otra en el gen M. Sin embargo, estos cambios fueron responsables en la disminución de la patogénesis por esta cepa (87). En el mismo sentido, un estudio reciente mostró que el proceso de atenuación de un aislado clínico del virus del sarampión (G954/genotipo B3.2), se dió con solo trece pases en un cultivo de células Vero a diferencia de otras cepas que requieren más de 70 pases para alcanzar el mismo estado. Los resultados mostraron que cuatro de los cinco cambios de aa ocurrieron en las secuencias del gen P/V/C (88). Las proteínas V y C juegan un papel muy importante en antagonizar las respuestas de interferón del hospedero contrarrestando la vía de señalización y la transcripción

(160). En este estudio no se llevó a cabo un proceso de atenuación del virus silvestre. Sin embargo, las secuencias de las proteínas V y C de una cepa vacunal Edmonston-Zagreb y la cepa Silvestre H1 del VS, se compararon en secuencia con una cepa control (Edmonston Gen Bank). Se observó que la secuencia de las proteínas V y C de la cepa vacunal fue idéntica a la cepa control a diferencia de la cepa silvestre que presentó un cambio de 26 y 9 aa entre las proteínas V y C respectivamente. Para el caso de la proteína V del virus silvestre, trece de estos cambios ya habían sido previamente reportados. Sin embargo, no fueron relacionados como importantes en la inhibición de la producción de IFN, de los 13 restantes no se tiene reporte. La proteína C presentó 9 cambios de aa, sólo cuatro de ellos ya habían sido previamente reportados. Estos cambios se encuentran dentro de la NLS y la secuencia de exportación nuclear (NES), así como dos cambios presentes en la secuencia de unión a SHCBP-1. Los 5 restantes no se han reportado. Sin embargo, con los resultados que tenemos no podríamos descartar totalmente que alguno de ellos tuviera que ver en la regulación del interferón y en el crecimiento viral respectivamente, para ello se requieren más estudios particularizando en cada uno de ellos.

La proteína C es producida sólo por 3 géneros (*Respirovirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*) dentro de la familia *Paramyxoviridae*. Sin embargo, esta proteína tiene muy poca homología en la secuencia de aa entre estos géneros. Las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal mostraron que la proteína C del VS colocaliza en el citoplasma celular con el complejo RNP

(proteínas N, P y L del VS). Estos datos sugieren que la proteína C juega un papel regulador en la síntesis viral por interacción con el complejo (8). Contrario a estos resultados, estudios previos demostraron mediante un sistema de dos híbridos y ensayos de pulldown con GST, que la proteína no interactúa directamente con ninguna de las proteínas del complejo RNP, pero sugieren que existe un interactor intermedio (162). La proteína SHCBP-1, identificada originalmente como una proteína de unión a Shc, es una molécula que actúa como adaptador de un gran número de receptores de la superficie celular y está involucrada en el crecimiento celular y apoptosis (171, 172), tiene la capacidad de unirse en el citoplasma celular, por un lado con la proteína C del VS (cepa silvestre Ichinose 323-Luci, región central aa ¹²⁷SIMVRSGLDDDS¹³⁸) para regular negativamente la actividad de la polimerasa viral y por otro lado a la proteína P, una subunidad del complejo RNP (164). En este sentido, ya que la proteína C actúa como un regulador negativo, recientemente se demostró que la fosforilación de la proteína P en los residuos S86 y/o S151 disminuye importantemente la actividad de la polimerasa viral. Esto sugiere que SHCBP-1 probablemente controle la fosforilación de la proteína P y que C regule el proceso de unión de SHCBP-1 con la proteína P disminuyendo la capacidad de la polimerasa viral. En otras palabras la proteína C actúa sobre la replicación viral regulando negativamente la concentración de los mARNs virales y con ello evita ser detectado por los receptores de la inmunidad innata, contribuyendo a la evasión de la respuesta de interferón del hospedero(173). Por otro lado, la disminución de la expresión de la proteína SHCBP-1 pero no la de Shc, mediante RNAs cortos, limitan importantemente el

crecimiento del VS, sin que se vea afectada la proliferación y viabilidad celular (164).

Nuestros resultados de secuencia indican que existen dos cambios de aa (R/Q¹³¹ y D/G¹³⁶) entre las secuencias de CE_{WT} vs CE_{EZ} en el sitio de unión con la proteína SHCBP-1. En este trabajo no evaluamos si esta mutación afecta directamente el crecimiento del VS, ya que sólo se emplearon los virus para obtener el RNA viral para consecuentemente obtener las secuencias de sus proteínas V y C.

En este trabajo observamos una localización sub-celular diferencial de la proteína C del VS. Nuestros ensayos *in-vitro* empleando transfecciones en células 293 muestran que la cepa vacunal en tiempos tempranos se expresó en el citoplasma y un poco en el núcleo de células transfectadas mientras que la cepa silvestre sólo estuvo presente en el núcleo celular a tiempos tempranos. Como ya se mencionó previamente algunos trabajos muestran que la localización de la proteína C se observa cerca del complejo RNP. Sin embargo, es probable que en el contexto de una infección viral *in-vivo* la localización sub-celular sea diferente. En nuestros ensayos la proteína C del VS se observa exclusivamente en el núcleo celular a las 24 horas post-transfección sin que esto descarte la probabilidad de que a tiempos más tempranos se haya expresado en el citoplasma para posteriormente ser translocada al núcleo celular. En este sentido sabemos que las proteínas que poseen un peso aproximado de entre 25 y 50 kDa pueden difundir pasivamente a través de los poros nucleares, esto pudiera explicar la localización celular de la proteína C en el núcleo (174). Sin embargo, se ha demostrado que la proteína C

de las cepas silvestres del VS son translocadas al núcleo mediante un transporte activo dependiente de la NLS y no por difusión pasiva (163). Resultados del mismo autor muestran que un solo cambio de aa en la NLS (R/G⁴⁴) de la proteína C vacunal vs la silvestre permiten claramente que se acumule en el citoplasma celular, interesantemente todas las cepas vacunales muestran de forma consistente este cambio de aa en esta secuencia. Esta mutación está presente en la secuencia de la proteína C_{EZ} utilizada en este trabajo y concuerda con lo ya reportado. En el mismo trabajo se demostró que la proteína C tiene el potencial de salir del núcleo utilizando una vía de exporte nuclear dependiente de la región de mantenimiento del cromosoma 1 (CRM1), comúnmente llamada exportina-1, la cual se une un motivo rico de leucinas (⁷⁶LxxxLxxLxL⁸⁵) que le pertenece a la NES de la proteína C del VS. El análisis de secuencia de aa de la proteína C, entre nuestras cepas, mostro que posee este mismo motivo, que encaja con los criterios establecidos para las NES (175) . Nosotros observamos un cambio en el último aa entre las NES de la cepa vacunal y la cepa silvestre (⁷⁶LERAMTTLKL-C^{EZ}/L⁸⁵ o C^{WT}/F⁸⁵). Además de este motivo observamos la presencia de otro río arriba en la secuencia de ambas proteínas (¹⁵⁹LTGDLLPSL¹⁶⁷) sin que en ellos se encontraran diferencias. A pesar de que en este trabajo se observó un cambio de aa entre las cepas, no creemos que esta sea la razón por la cual C_{WT} permanezca más tiempo en el núcleo, ya que la secuencia de leucinas de la NES no se encuentra afectada, además de ello la segunda secuencia NES es exactamente igual entre las cepas haciendo esto improbable. Por otro lado con los ensayos a partir de las mutantes de la NLS (C_{EZ}ΔNLS y C_{WT}ΔNLS) demostramos que la localización sub-celular de

la proteína C (Fig. 11) no tienen la capacidad de translocarse al núcleo.

Se ha establecido que la que la proteína C del VS silvestre, a diferencia de la cepas vacunales, posee una mayor capacidad de regular la producción de interferón tipo 1. El hecho que todas las cepas del VS silvestre *in-vivo* mantengan intacta la NLS probablemente tenga que ver con la fuerte regulación de la producción de interferón, la cual se ve severamente reducida toda vez que pasan por un proceso de adaptación a cultivo celular (proceso de atenuación). Invariablemente todas las cepas vacunales analizadas en trabajos previos y en el presente, muestran un cambio de aa dentro de la NLS de R44 a G44. Apoyados en este hecho, en este trabajo analizamos la regulación de los transcritos del $INF\beta$ y otras citocinas (Fig.13) utilizando transfecciones de células 293 con los plásmidos C_{EZ} , C_{WT} , $C_{EZ}/\Delta NLS$, $C_{WT}/\Delta NLS$, V_{WT} y GFP-V5. Los resultados con ensayos duales Renila-Luciferasa en células HEK293 muestran que la proteína C_{WT} posee una mayor habilidad de regular la producción de $INF\beta$ comparado con la proteína C_{EZ} . Sin embargo, al mutar la NLS, se observó que la proteína C_{WT} pierde la capacidad de regular los transcritos de $INF\beta$. Por otro lado se demostró mediante ensayos de RT-PCR en células HEK293 y A549 transitoria y establemente transfectadas que la proteína C_{WT} regula de forma específica los transcritos de $INF\beta$ y no así los de otras citocinas (Fig. 14). Los resultados con RT-PCR muestran que existe un adecuado exporte del núcleo al citoplasma de los mRNA de $IFN\beta$, IL-6 e IL-10 y por ello es muy improbable que la proteína C regule el exporte de los mensajeros, estos hechos indicarían que el mecanismo de acción

de la proteína C para regular específicamente el IFN β se lleve a cabo desde el núcleo de la célula.

La transcripción del IFN es un proceso altamente regulado que implica una serie de pasos donde inicialmente se estimulan algunos PRRs específicos por microorganismos iniciando una vía de señalización que desemboca en la translocación de factores transcripcionales como IRF3/7, AP-1 y NF κ B al núcleo celular, esto provoca el encendido del promotor de IFN (101). Estudios previos han demostrado que la proteína C del VS no se asocia, degrada o regula la vía de señalización del IFN vía IRF3, como se ha observado con otros virus de RNA (176), si no que modula los niveles de síntesis de RNA viral contribuyendo a evadir la respuesta de IFN, debido particularmente a que si esta proteína está ausente existe un incremento del RNA viral en la célula, lo cual activa la vía de señalización para la producción de IFN mediante PKR (177).

Por otro lado, es probable que para lograr la regulación del promotor del IFN, inducida por la proteína C del VS, se requieran diversas interacciones con el complejo de la polimerasa II. En nuestros ensayos encontramos que la proteína C_{EZ} interfiere moderadamente los transcritos del INF β . Sin embargo, es insuficiente para compararla con la fuerte inhibición que induce la proteína C_{WT}. Otra posibilidad es que la proteína C pudiera actuar como una proteína de unión a DNA o RNA, debido a que típicamente las proteínas que lo realizan están enriquecidas de residuos de lisina y arginina, similar a las NLS que posee la proteína C del VS utilizada en este trabajo. En este sentido nuestros datos

sugieren que la NLS juega un papel importante en la permanencia de la proteína C dentro del núcleo y que esto favorece la función de la proteína C_{WT} en la regulación de los transcritos del INF β .

El mecanismo exacto que posee la proteína C del VS_{WT} para inhibir la transcripción del INF β desde el núcleo celular no se conoce. Para ello se requieren más estudios para concluir el mecanismo exacto.

21. Conclusiones

- La localización sub-celular de la proteína C_{WT} difiere de la C_{EZ}.
- La localización nuclear de la proteína C es dependiente de la NLS.
- La proteína C_{WT} inhibe la inducción del promotor de IFN β .
- La proteína C inhibe específicamente la inducción del IFN β y no otras citocinas.

22. BIBLIOGRAFIA

1. **Riddell MA, Rota JS, Rota PA.** 2005. Review of the temporal and geographical distribution of measles virus genotypes in the prevaccine and postvaccine eras. *Virology journal* **2**:87.
2. **OMS.** Measles. Fact sheet No.286. December 2009.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en>.
3. **Slifka MK, Homann D, Tishon A, Pagarigan R, Oldstone MB.** 2003. Measles virus infection results in suppression of both innate and adaptive immune responses to secondary bacterial infection. *The Journal of clinical investigation* **111**:805-810.
4. **Naniche D.** 2009. Human immunology of measles virus infection. *Current topics in microbiology and immunology* **330**:151-171.
5. **Griffin DE.** 2010. Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunological reviews* **236**:176-189.
6. **Griffin DE.** 2001. Measles virus. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.:1401-1441.
7. **Cattaneo R, Kaelin K, Baczko K, Billeter MA.** 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* **56**:759-764.
8. **Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD.** 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *Journal of virology* **53**:908-919.
9. **Horikami SM, Smallwood S, Bankamp B, Moyer SA.** 1994. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. *Virology* **205**:540-545.
10. **Schoehn G, Mavrakis M, Albertini A, Wade R, Hoenger A, Ruigrok RW.** 2004. The 12 A structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *Journal of molecular biology* **339**:301-312.
11. **Castaneda SJ, Wong TC.** 1990. Leader sequence distinguishes between translatable and encapsidated measles virus RNAs. *Journal of virology* **64**:222-230.
12. **Huber M, Cattaneo R, Spielhofer P, Orvell C, Norrby E, Messerli M, Perriard JC, Billeter MA.** 1991. Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology* **185**:299-308.
13. **Bankamp B, Horikami SM, Thompson PD, Huber M, Billeter M, Moyer SA.** 1996. Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology* **216**:272-277.
14. **Longhi S, Receveur-Brechot V, Karlin D, Johansson K, Darbon H, Bhella D, Yeo R, Finet S, Canard B.** 2003. The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *The Journal of biological chemistry* **278**:18638-18648.
15. **Laine D, Bourhis JM, Longhi S, Flacher M, Cassard L, Canard B, Sautes-Fridman C, Rabourdin-Combe C, Valentin H.** 2005. Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through NTAIL-NR and N CORE-FcγRIIB1 interactions, respectively. *The Journal of general virology* **86**:1771-1784.
16. **tenOever BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R, Hiscott J.** 2002. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *Journal of virology* **76**:3659-3669.
17. **Moll M, Pfeuffer J, Klenk HD, Niewiesk S, Maisner A.** 2004. Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *The Journal of general virology* **85**:1019-1027.
18. **Colf LA, Juo ZS, Garcia KC.** 2007. Structure of the measles virus hemagglutinin. *Nature structural & molecular biology* **14**:1227-1228.
19. **Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, Norrby E.** 1994. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *The Journal of general virology* **75 (Pt 5)**:1043-1052.
20. **Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y.** 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**:893-897.
21. **Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD.** 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**:295-305.
22. **Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D.** 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *Journal of virology* **67**:6025-6032.
23. **Tahara M, Takeda M, Seki F, Hashiguchi T, Yanagi Y.** 2007. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *Journal of virology* **81**:2564-2572.

24. **Koethe S, Avota E, Schneider-Schaulies S.** 2012. Measles virus transmission from dendritic cells to T cells: formation of synapse-like interfaces concentrating viral and cellular components. *Journal of virology* **86**:9773-9781.
25. **Avota E, Gulbins E, Schneider-Schaulies S.** 2011. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS pathogens* **7**:e1001290.
26. **Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD.** 2011. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS pathogens* **7**:e1002240.
27. **Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prufer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB, Jr., Cichutek K, von Messling V, Lopez M, Cattaneo R.** 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **480**:530-533.
28. **Yin HS, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS.** 2006. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* **439**:38-44.
29. **Watanabe M, Hirano A, Stenglein S, Nelson J, Thomas G, Wong TC.** 1995. Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *Journal of virology* **69**:3206-3210.
30. **Richardson CD, Choppin PW.** 1983. Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action. *Virology* **131**:518-532.
31. **Hull JD, Krah DL, Choppin PW.** 1987. Resistance of a measles virus mutant to fusion inhibitory oligopeptides is not associated with mutations in the fusion peptide. *Virology* **159**:368-372.
32. **Zhang P, Li L, Hu C, Xu Q, Liu X, Qi Y.** 2005. Interactions among measles virus hemagglutinin, fusion protein and cell receptor signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) indicating a new fusion-trimer model. *Journal of biochemistry and molecular biology* **38**:373-380.
33. **Moll M, Klenk HD, Herrler G, Maisner A.** 2001. A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* **276**:17887-17894.
34. **Cathomen T, Naim HY, Cattaneo R.** 1998. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *Journal of virology* **72**:1224-1234.
35. **von Messling V, Cattaneo R.** 2003. N-linked glycans with similar location in the fusion protein head modulate paramyxovirus fusion. *Journal of virology* **77**:10202-10212.
36. **Bellini WJ, Englund G, Richardson CD, Rozenblatt S, Lazzarini RA.** 1986. Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *Journal of virology* **58**:408-416.
37. **Naim HY, Ehler E, Billeter MA.** 2000. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *The EMBO journal* **19**:3576-3585.
38. **Cathomen T, Mrkic B, Spohner D, Drillien R, Naef R, Pavlovic J, Aguzzi A, Billeter MA, Cattaneo R.** 1998. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *The EMBO journal* **17**:3899-3908.
39. **Curran J, Boeck R, Lin-Marq N, Lupas A, Kolakofsky D.** 1995. Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology* **214**:139-149.
40. **Karlin D, Longhi S, Receveur V, Canard B.** 2002. The N-terminal domain of the phosphoprotein of Morbilliviruses belongs to the natively unfolded class of proteins. *Virology* **296**:251-262.
41. **Smallwood S, Ryan KW, Moyer SA.** 1994. Deletion analysis defines a carboxyl-proximal region of Sendai virus P protein that binds to the polymerase L protein. *Virology* **202**:154-163.
42. **Harty RN, Palese P.** 1995. Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH₂- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself. *The Journal of general virology* **76 (Pt 11)**:2863-2867.
43. **Johansson K, Bourhis JM, Campanacci V, Cambillau C, Canard B, Longhi S.** 2003. Crystal structure of the measles virus phosphoprotein domain responsible for the induced folding of the C-terminal domain of the nucleoprotein. *The Journal of biological chemistry* **278**:44567-44573.
44. **Thomas SM, Lamb RA, Paterson RG.** 1988. Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5. *Cell* **54**:891-902.
45. **Poole E, He B, Lamb RA, Randall RE, Goodbourn S.** 2002. The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. *Virology* **303**:33-46.
46. **Paterson RG, Leser GP, Shaughnessy MA, Lamb RA.** 1995. The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* **208**:121-131.
47. **Li T, Chen X, Garbutt KC, Zhou P, Zheng N.** 2006. Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell* **124**:105-117.

48. **Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y.** 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *The Journal of general virology* **85**:2991-2999.
49. **Caignard G, Bourai M, Jacob Y, Infection MpIMAP, Tangy F, Vidalain PO.** 2009. Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* **383**:112-120.
50. **Pfaller CK, Conzelmann KK.** 2008. Measles virus V protein is a decoy substrate for I κ B kinase alpha and prevents Toll-like receptor 7/9-mediated interferon induction. *Journal of virology* **82**:12365-12373.
51. **He B, Paterson RG, Stock N, Durbin JE, Durbin RK, Goodbourn S, Randall RE, Lamb RA.** 2002. Recovery of paramyxovirus simian virus 5 with a V protein lacking the conserved cysteine-rich domain: the multifunctional V protein blocks both interferon-beta induction and interferon signaling. *Virology* **303**:15-32.
52. **Wansley EK, Parks GD.** 2002. Naturally occurring substitutions in the P/V gene convert the noncytopathic paramyxovirus simian virus 5 into a virus that induces alpha/beta interferon synthesis and cell death. *J Virol* **76**:10109-10121.
53. **Lin GY, Lamb RA.** 2000. The paramyxovirus simian virus 5 V protein slows progression of the cell cycle. *J Virol* **74**:9152-9166.
54. **Devaux P, von Messling V, Songsunthong W, Springfield C, Cattaneo R.** 2007. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* **360**:72-83.
55. **Fontana JM, Bankamp B, Bellini WJ, Rota PA.** 2008. Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology* **374**:71-81.
56. **Schuhmann KM, Pfaller CK, Conzelmann KK.** 2011. The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity. *Journal of virology* **85**:3162-3171.
57. **Valsamakis A, Schneider H, Auwaerter PG, Kaneshima H, Billeter MA, Griffin DE.** 1998. Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J Virol* **72**:7754-7761.
58. **Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA.** 2003. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* **315**:389-397.
59. **Bankamp B, Kearney SP, Liu X, Bellini WJ, Rota PA.** 2002. Activity of polymerase proteins of vaccine and wild-type measles virus strains in a minigenome replication assay. *Journal of virology* **76**:7073-7081.
60. **Black FL.** 1966. Measles endemicity in insular populations: critical community size and its evolutionary implication. *Journal of theoretical biology* **11**:207-211.
61. **WHO.** WHO. Measles outbreaks and progress towards meeting measles pre-elimination goals: WHO African Region, 2009–2010. *Wkly Epidemiol Rec* 2011; 86: 129–36.
62. **WHO.** 2015. Measles Outbreak — California, December 2014–February 20, 2015 Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR): 64(06);153-154.
63. **Permar SR, Moss WJ, Ryon JJ, Monze M, Cutts F, Quinn TC, Griffin DE.** 2001. Prolonged measles virus shedding in human immunodeficiency virus-infected children, detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **183**:532-538.
64. **WHO. World Health Assembly Resolution WHA 52.20. Reducing global measles mortality. Geneva: World Health Organization.** 2003.
65. **Wolfson LJ, Strebel PM, Gacic-Dobo M, Hoekstra EJ, McFarland JW, Hersh BS, Measles I.** 2007. Has the 2005 measles mortality reduction goal been achieved? A natural history modelling study. *Lancet* **369**:191-200.
66. **WHO., .** 2009. Global reductions in measles mortality 2000–2008 and the risk of measles resurgence. *Weekly Epidemiol Rec* 2009; 84: 509–16.
67. **WHO.** 2005. United Nations Children’s Fund. Global immunization vision and strategy 2006–2015. 2005. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
68. **SSA.,** <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/indice-2015.htm>. **DGdE.** 2015.
69. **Velazquez-Monroy OJ, Alvarez-Lucas CH, Lezana-Fernandez MA, Avila-Figueroa C.** 1990. [Epidemiologic overview of measles in Mexico: current situation and perspectives]. *Boletin medico del Hospital Infantil de Mexico* **47**:462-473.
70. **Garenne M.** 1994. Sex differences in measles mortality: a world review. *International journal of epidemiology* **23**:632-642.
71. **Tierney LM, Jr., Wang KC.** 2006. Images in clinical medicine. Koplik’s spots. *The New England journal of medicine* **354**:740.
72. **Morley D.** 1969. Severe measles in the tropics. I. *British medical journal* **1**:297-300 contd.
73. **Feigin RD, CJ.** 1998. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases.* 4edición.:2054-2074.

74. **Johnson RT, Griffin DE, Hirsch RL, Wolinsky JS, Roedenbeck S, Lindo de Soriano I, Vaisberg A.** 1984. Measles encephalomyelitis--clinical and immunologic studies. *The New England journal of medicine* **310**:137-141.
75. **Turner A, Jeyaratnam D, Haworth F, Sinha MD, Hughes E, Cohen B, Jin L, Kidd IM, Rigden SP, MacMahon E.** 2006. Measles-associated encephalopathy in children with renal transplants. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **6**:1459-1465.
76. **Freeman AF, Jacobsohn DA, Shulman ST, Bellini WJ, Jaggi P, de Leon G, Keating GF, Kim F, Pachman LM, Kletzel M, Duerst RE.** 2004. A new complication of stem cell transplantation: measles inclusion body encephalitis. *Pediatrics* **114**:e657-660.
77. **Bellini WJ, Rota JS, Lowe LE, Katz RS, Dyken PR, Zaki SR, Shieh WJ, Rota PA.** 2005. Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *J Infect Dis* **192**:1686-1693.
78. **Campbell H, Andrews N, Brown KE, Miller E.** 2007. Review of the effect of measles vaccination on the epidemiology of SSPE. *International journal of epidemiology* **36**:1334-1348.
79. **Lemon K, de Vries RD, Mesman AW, McQuaid S, van Amerongen G, Yuksel S, Ludlow M, Rennick LJ, Kuiken T, Rima BK, Geijtenbeek TB, Osterhaus AD, Duprex WP, de Swart RL.** 2011. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS pathogens* **7**:e1001263.
80. **Griffin DE. LR, Martin MA., Roizman B., Straus EE.,** . *Fields Virology*, Vol 1 Fourth Edition.1401-1442.
81. **Esolen LM. WB, Moench TR., Griffin DE. .** 1993. Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* **168**:47-52.
82. **de Vries RD, Lemon K, Ludlow M, McQuaid S, Yuksel S, van Amerongen G, Rennick LJ, Rima BK, Osterhaus AD, de Swart RL, Duprex WP.** 2010. In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *Journal of virology* **84**:4714-4724.
83. **Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray PB, Jr., McChesney MB, Cattaneo R.** 2008. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *The Journal of clinical investigation* **118**:2448-2458.
84. **Leonard VH, Hodge G, Reyes-Del Valle J, McChesney MB, Cattaneo R.** 2010. Measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule (SLAM; CD150) is attenuated and induces strong adaptive immune responses in rhesus monkeys. *Journal of virology* **84**:3413-3420.
85. **Takeuchi K, Nagata N, Kato SI, Ami Y, Suzaki Y, Suzuki T, Sato Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Mori K, Van Nguyen N, Kimura H, Nagata K.** 2012. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *Journal of virology* **86**:3027-3037.
86. **Takeda M, Kato A, Kobune F, Sakata H, Li Y, Shioda T, Sakai Y, Asakawa M, Nagai Y.** 1998. Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J Virol* **72**:8690-8696.
87. **Takeuchi K, Miyajima N, Kobune F, Tashiro M.** 2000. Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* **20**:253-257.
88. **Druelle J, Sellin CI, Waku-Kouomou D, Horvat B, Wild FT.** 2008. Wild type measles virus attenuation independent of type I IFN. *Virology journal* **5**:22.
89. **Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Wang HP, Sidhu MS, Udem SA.** 2001. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* **75**:910-920.
90. **Gerlier D, Valentin H.** 2009. Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity. *Current topics in microbiology and immunology* **329**:163-191.
91. **Akira S, Takeda K, Kaisho T.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**:675-680.
92. **Kumar H, Kawai T, Akira S.** 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* **30**:16-34.
93. **Janeway CA, Jr., Medzhitov R.** 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**:197-216.
94. **Inohara N, Nunez G.** 2001. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* **20**:6473-6481.
95. **Wilkins C, Gale M, Jr.** 2010. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Current opinion in immunology* **22**:41-47.
96. **Takeda K, Akira S.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* **17**:1-14.
97. **Honda K. YH, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh W, Taniguchi T.** 2004. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:15416-15421.

98. **Hoshino K, ST, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, Ohara O, Akira S, Kaisho T.** 2006. Ikb kinase-a is critical for interferon-a production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* **440**:949-953.
99. **Iwasaki A. MR.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987-995.
100. **Murali A, Li X, Ranjith-Kumar CT, Bhardwaj K, Holzenburg A, Li P, Kao CC.** 2008. Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response. *The Journal of biological chemistry* **283**:15825-15833.
101. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
102. **Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD.** 1998. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry* **67**:227-264.
103. **Goodbourn S, Didcock L, Randall RE.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *The Journal of general virology* **81**:2341-2364.
104. **Katze MG, He Y, Gale M, Jr.** 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature reviews. Immunology* **2**:675-687.
105. **MacMicking JD.** 2004. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends in immunology* **25**:601-609.
106. **Qureshi SA, Salditt-Georgieff M, Darnell JE, Jr.** 1995. Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3829-3833.
107. **Samuel CE.** 2011. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral. *Virology* **411**:180-193.
108. **Hahm B.** 2009. Hostile communication of measles virus with host innate immunity and dendritic cells. *Current topics in microbiology and immunology* **330**:271-287.
109. **Moench TR, GD, Obriecht CR., Vaisberg AJ., and Johnson RT. .** 1998. Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *J Infect Dis* **158**:433-442.
110. **Sakaguchi M. YY, K. Yamanouchi T., Nagashima SK, and Tadeka K.** 1986. Growth of measles virus in epithelial cells and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys. *Microbiol Immunol* **30**:1067-1073.
111. **McWilliams AS. ND, Thomas JA., and Holt PG.** 1994. Rapid dendritic cell recruitment as a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* **179**:1331-1336.
112. **Lande R, Gilliet M.** 2010. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1183**:89-103.
113. **Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S.** 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**:1526-1529.
114. **Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M.** 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**:107-119.
115. **Siegal FP KN, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, et al.** 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**:1835-1837.
116. **Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J.** 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**:225-234.
117. **Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, Shepherd D, Colonna M, Cerundolo V.** 2003. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *European journal of immunology* **33**:1052-1062.
118. **Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, Bhardwaj N.** 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* **101**:3520-3526.
119. **Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L.** 2002. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **169**:6673-6676.
120. **Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L.** 2002. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* **63**:1164-1171.
121. **Ryan LK, Diamond G, Amrute S, Feng Z, Weinberg A, Fitzgerald-Bocarsly P.** 2003. Detection of HBD1 peptide in peripheral blood mononuclear cell subpopulations by intracellular flow cytometry. *Peptides* **24**:1785-1794.
122. **Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ.** 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* **192**:219-226.

123. **de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S, Yuksel S, Geijtenbeek TB, Duprex WP, Osterhaus AD.** 2007. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS pathogens* **3**:e178.
124. **Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies S.** 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *Journal of virology* **76**:8729-8736.
125. **Sato H, Miura R, Kai C.** 2005. Measles virus infection induces interleukin-8 release in human pulmonary epithelial cells. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **28**:311-320.
126. **Grosjean I, Caux C, Bella C, Berger I, Wild F, Banchereau J, Kaiserlian D.** 1997. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* **186**:801-812.
127. **Duhen T, Herschke F, Azocar O, Druelle J, Plumet S, Delprat C, Schicklin S, Wild TF, Roubourdin-Combe C, Gerlier D, Valentin H.** 2010. Cellular receptors, differentiation and endocytosis requirements are key factors for type I IFN response by human epithelial, conventional and plasmacytoid dendritic infected cells by measles virus. *Virus Res* **152**:115-125.
128. **Schlender J, Hornung V, Finke S, Gunthner-Biller M, Marozin S, Brzozka K, Moghim S, Endres S, Hartmann G, Conzelmann KK.** 2005. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *Journal of virology* **79**:5507-5515.
129. **Hornung V, Schlender J, Guenther-Biller M, Rothenfusser S, Endres S, Conzelmann KK, Hartmann G.** 2004. Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *Journal of immunology* **173**:5935-5943.
130. **Griffin DE WB.** 1993. Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* **168**:275-281.
131. **Moss WJ, Ryon JJ, Monze M, Griffin DE.** 2002. Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J Infect Dis* **186**:879-887.
132. **Good RA., Zak SJ.** 1956. Disturbances in gamma globulin synthesis as experiments of nature. *Pediatrics* **18**:109-149.
133. **Markowitz LE. CF, Roldan EO., Saldana MJ., Roach KC., Hutchins SS., Preblud SR., Mitchell CD., and Scott GB.** 1988. Fatal measles pneumonia without rash in a child with AIDS. *J Infect Dis* **158**:480-483.
134. **Graves M. GD, Johnson RT.** 1984. Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infection. *J Virol* **49**:409-412.
135. **Gans HA. AA, Galinus J., Logan L., DeHovitz R., Maldonado Y. .** 1998. Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *J Am Med Assoc* **280**:527-532.
136. **Ovsyannikova IG. RK, Jacobson RM., Oberg AL., Klee GG., Poland GA.** 2003. Cytokine production patterns and antibody response to measles vaccine. *Vaccine* **21**:3946-3953.
137. **Panum P.** 1938. Observations made during the epidemic of measles on the Faroe Islands in the year 1846. *Med Classics* **3**:829-886.
138. **Lamb R, Parks G.** 2013. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, DM.; Howley, PM., editors. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer and Lippincott Williams and Wilkins:957-995.
139. **Akramuzzaman SM, Cutts FT, Wheeler JG, Hossain MJ.** 2000. Increased childhood morbidity after measles is short-term in urban Bangladesh. *American journal of epidemiology* **151**:723-735.
140. **Tamashiro VG, Perez HH, Griffin DE.** 1987. Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *The Pediatric infectious disease journal* **6**:451-454.
141. **Coovadia HM, Wesley A, Henderson LG, Brain P, Vos GH, Hallett AF.** 1978. Alterations in immune responsiveness in acute measles and chronic post-measles chest disease. *International archives of allergy and applied immunology* **56**:14-23.
142. **Ryon JJ, Moss WJ, Monze M, Griffin DE.** 2002. Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **9**:994-1003.
143. **Hirsch RL, Griffin DE, Johnson RT, Cooper SJ, Lindo de Soriano I, Roedenbeck S, Vaisberg A.** 1984. Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clinical immunology and immunopathology* **31**:1-12.
144. **Karp CL. WM, Wahl LM., Ahearn JM., Cuomo PJ., Sherry B., Trinchieri G., Griffin DE.** 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* **273**:228-231.
145. **Yu XL, Cheng YM, Shi BS, Qian FX, Wang FB, Liu XN, Yang HY, Xu QN, Qi TK, Zha LJ, Yuan ZH, Ghildyal R.** 2008. Measles virus infection in adults induces production of IL-10 and is associated with increased CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology* **181**:7356-7366.

146. **de Vries RD, McQuaid S, van Amerongen G, Yuksel S, Verburgh RJ, Osterhaus AD, Duprex WP, de Swart RL.** 2012. Measles immune suppression: lessons from the macaque model. *PLoS pathogens* **8**:e1002885.
147. **Mina MJ, Metcalf CJ, de Swart RL, Osterhaus AD, Grenfell BT.** 2015. Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality. *Science* **348**:694-699.
148. **Enders JF, Peebles TC.** 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**:277-286.
149. **Katz SL, MM, Enders JF.** . 1958. Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **97**:23-29.
150. **Fernández-De-Castro J.** 1983. Measles in México. *Rev Infect Dis* **5**:422-426.
151. **Beck M. Mjd.** 1985. Characteristics of the Edmonton-Zagreb vaccine produced in Yugoslavia and México, Workshop on the use of measles vaccine in children under 9 months of age. . CDC Atlanta.
152. <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=532>.
153. **Panamerican H, Organization.** 1994. Measles elimination by the year 2000. . *EPI Newsletter* **16**:1-2.
154. **Sabin AB, Flores Arechiga A, Fernandez de Castro J, Sever JL, Madden DL, Shekarchi I, Albrecht P.** 1983. Successful immunization of children with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine. I. Different results with undiluted human diploid cell and chick embryo fibroblast vaccines. *JAMA* **249**:2651-2662.
155. **Rager-Zisman B, Bazarsky E, Skibin A, Chamney S, Belmaker I, Shai I, Kordysh E, Griffin DE.** 2003. The effect of measles-mumps-rubella (MMR) immunization on the immune responses of previously immunized primary school children. *Vaccine* **21**:2580-2588.
156. **Hussey GD, Goddard EA, Hughes J, Ryon JJ, Kerran M, Carelse E, Strebel PM, Markowitz LE, Moodie J, Barron P, Latief Z, Sayed R, Beatty D, Griffin DE.** 1996. The effect of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines on immune response in infants. *J Infect Dis* **173**:1320-1326.
157. **Ndumbe PM, Gilchrist SA, Pabst H, Sama MT, Mbede J.** 1995. Comparison of Edmonston-Zagreb, Connaught and Schwarz measles vaccines in Cameroonian infants aged 3-8 months. *Vaccine* **13**:276-280.
158. **Leuridan E, Hens N, Hutse V, Ieven M, Aerts M, Van Damme P.** 2010. Early waning of maternal measles antibodies in era of measles elimination: longitudinal study. *Bmj* **340**:c1626.
159. **Devaux P, Hodge G, McChesney MB, Cattaneo R.** 2008. Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *Journal of virology* **82**:5359-5367.
160. **Fontana JM, Bankamp B, Rota PA.** 2008. Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunological reviews* **225**:46-67.
161. **Devaux P, Cattaneo R.** 2004. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *Journal of virology* **78**:11632-11640.
162. **Liston P, DiFlumeri C, Briedis DJ.** 1995. Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus Res* **38**:241-259.
163. **Nishie T, Nagata K, Takeuchi K.** 2007. The C protein of wild-type measles virus has the ability to shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Microbes Infect* **9**:344-354.
164. **Ito M, Iwasaki M, Takeda M, Nakamura T, Yanagi Y, Ohno S.** 2013. Measles virus nonstructural C protein modulates viral RNA polymerase activity by interacting with host protein SHCBP1. *Journal of virology* **87**:9633-9642.
165. **McAllister CS, Toth AM, Zhang P, Devaux P, Cattaneo R, Samuel CE.** 2010. Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus. *Journal of virology* **84**:380-386.
166. **Sparrer KM, Pfaller CK, Conzelmann KK.** 2011. Measles virus C protein interferes with interferon beta transcription in the nucleus. *Journal of virology*.
167. **Hsu EC, Sarangi F, Iorio C, Sidhu MS, Udem SA, Dillehay DL, Xu W, Rota PA, Bellini WJ, Richardson CD.** 1998. A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *Journal of virology* **72**:2905-2916.
168. **Sparrer KM, Pfaller CK, Conzelmann KK.** 2012. Measles virus C protein interferes with Beta interferon transcription in the nucleus. *Journal of virology* **86**:796-805.
169. **Mori T, Sasaki K, Hashimoto H, Makino S.** 1993. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of genomic RNA of the AIK-C strain of attenuated measles virus. *Virus Genes* **7**:67-81.
170. **Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, Xu W, Rota PA.** 2011. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis* **204 Suppl 1**:S533-548.
171. **Schmandt R, Liu SK, McGlade CJ.** 1999. Cloning and characterization of mPAL, a novel Shc SH2 domain-binding protein expressed in proliferating cells. *Oncogene* **18**:1867-1879.

172. **Gotoh N, Tojo A, Shibuya M.** 1996. A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *The EMBO journal* **15**:6197-6204.
173. **Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Shirogane Y, Iwasaki M, Yanagi Y.** 2008. Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *Journal of virology* **82**:8296-8306.
174. **Gorlich D, Kutay U.** 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:607-660.
175. **Henderson BR, Eleftheriou A.** 2000. A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Experimental cell research* **256**:213-224.
176. **Versteeg GA, Garcia-Sastre A.** 2010. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Current opinion in microbiology* **13**:508-516.
177. **Toth AM, Devaux P, Cattaneo R, Samuel CE.** 2009. Protein kinase PKR mediates the apoptosis induction and growth restriction phenotypes of C protein-deficient measles virus. *Journal of virology* **83**:961-968.