

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**CENTRO UNIVERSITARIO DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

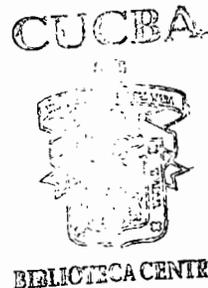


**EL RUBULAVIRUS PORCINO (PoRV) INFECTA NEURONAS Y  
CÉLULAS GLIALES A TRAVÉS DE UNA SIALOGLUCOPROTEÍNA  
QUE FUNCIONA COMO RECEPTOR.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE:  
TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**PRESENTA:  
DIANA VALENTINA GODOY MARTÍNEZ**



Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Diciembre del 2004



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

***Coordinación de titulación y Carrera de Licenciatura***  
***en Biología***

058/ C. C. BIOLOGÍA

**C. DIANA VALENTINA GODOY MARTINEZ**  
**PRESENTE**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: “ **EL RUBULAVIRUS PORCINO (PoRV) INFECTA NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES A TRAVÉS DE UNA SIALOGLUCOPROTEÍNA QUE FUNCIONA COMO RECEPTOR** ” para obtener la Licenciatura en Biología

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de dicho trabajo al **DRA. MARIA LUISA MENDOZA MAGAÑA** y como asesor **DR. MARIO ALBERTO RAMÍREZ HERRERA**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo

**ATENTAMENTE**  
**“PIENSA Y TRABAJA”**

**Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 7 de Diciembre del 2004**

**DR. CARLOS ALVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**DRA. ANA ISABEL RAMIREZ QUINTANA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Dr. Carlos Álvarez Moya.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Carrera de Licenciado en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS, con el título: EL RUBULAVIRUS PORCINO (PoRV) INFECTA NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES A TRAVÉS DE UNA SIALOGLUCOPROTEÍNA QUE FUNCIONA COMO RECEPTOR que realizó la pasante DIANA VALENTINA GODOY MARTINEZ con número de código 394281016 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para la autorización de impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

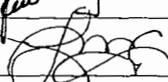
ATENTAMENTE

Guadalajara, Jalisco a 1 de diciembre del 2004

  
 Dra. María Luisa Mendoza Magaña  
 Director de Tesis

  
 Dr. Mario Alberto Ramírez Herrera  
 Asesor de Tesis

*Handwritten notes:*  
 H. B. / 6 / 10

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado el anteproyecto	Fecha de aprobación
Q.F.B. Margarita Bonilla Moreno		Dic. 03/04.
M. en C. José de Jesús Castañeda Sandoval		Dic/02/2004.-
Dra. en C. Laura Guadalupe Medina Ceja		Dic/02/2004
Supl. Dr. en C. Carlos Álvarez Moya.		Dic/06/04

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

## DEDICATORIA

A mis padres, Adolfo y Elena, gracias por el apoyo y amor incondicional que siempre me han dado, por la fe que han tenido en mí, por tener confianza en lo que hago, por enseñarme a terminar lo que empiezo (lento pero seguro) y por ser, además de mis padres, mis amigos. Los quiero mucho, mucho.

A mis hermanos Adolfo, Rocio y Hugo, y a mi sobrina Xochilt, siempre están en mi corazón aunque no estemos juntos, I love you.

A Gabriel Ochoa, quien ha estado conmigo en los momentos felices y en los difíciles y quien me ha ayudado aprender a luchar contra las adversidades. Hemos compartido muchos momentos felices juntos, te quiero.

A Gaby Ochoa Valdez, amiguita, estés donde estés sin ti hubiera sido muy difícil concluir esta etapa de mi vida. Siempre tendré recuerdos bonitos de ti.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. en C. María Luisa Mendoza Magaña, le agradezco el tiempo que me ha dedicado y los conocimientos que me ha transmitido durante estos años.

A mi asesor el Dr. en C. Mario Alberto Ramírez Herrera gracias por sus recomendaciones y apoyo para llevar a cabo mi trabajo.

Al laboratorio de Neurofisiología. A Leticia Ontiveros y a Hugo Guerrero, gracias por ser mis amigos de tiempo completo y por sus buenos consejos.

A mis sinodales: Q.F.B. Margarita Bonilla Moreno, Dra. en C. Laura Medina Ceja y al M. en C. José de Jesús Castañeda Sandoval les agradezco su apoyo en la realización de la escritura del presente trabajo.

A Cristina Pérez y a José de Jesús Ochoa, aprecio que me hagan sentir como parte de su familia y por todas las atenciones que han tenido conmigo desde que los he conocido, gracias.

A mis amigos y familiares, gracias por su apoyo y por todos los buenos momentos.

## RESUMEN

El Sistema Nervioso Central (SNC) es un blanco para un gran número de infecciones virales. Los virus que son capaces de infectar al SNC producen diferentes efectos patológicos y manifestaciones clínicas. Uno de los virus que infecta al SNC de cerdos es el rubulavirus porcino (PoRV), el cual pertenece a la familia Paramixoviridae. Se ha encontrado que el PoRV es letal en cerdos neonatos mientras que en cerdos adultos puede causar infertilidad. El análisis de la función de los oligosacáridos en la capacidad de infección a células neuronales, tanto a neuronas y células gliales, es importante ya que en otros estudios se ha encontrado que el papel de los oligosacáridos es importante en la unión del virus a las células hospederas. El PoRV es capaz de infectar tanto a neuronas como a células gliales. En el presente estudio se trabajó con cultivos neuronales de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo de cerdos neonatos, estos cultivos fueron tratados con N-glucosidasa F y neuraminidasa y posteriormente fueron infectados con el PoRV, se observó una disminución de la infección al utilizar estas enzimas. Además, se encontró que el PoRV preincubado con los anticuerpos contra la HN viral y (o) la proteína F disminuyó su capacidad de infección en los cultivos infectados con el mismo.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES .....	3
Virus.....	3
Oligosacáridos N-ligados y O-ligados.....	4
Ácido Siálico.....	5
Rubulavirus porcino.....	5
Características del rubulavirus porcino.....	6
Datos Epidemiológicos.....	7
Sintomatología.....	8
Histopatología.....	8
Moléculas Receptoras al PoRV.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Obtención del virus.....	14
Anticuerpos policlonales contra PoRV.....	14
Preparación de anticuerpos contra las proteínas de envoltura viral hemaglutinina- neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) del PoRV.....	14
Soluciones y amortiguadores.....	14
Obtención Neuronas y Células Gliales.....	15
Preparación de las Placas de Cultivo.....	15
Cultivo Celular de Neuronas y Glia (Cultivo Mixto).....	16
Cultivo de Neuronas.....	16
Cultivo de Células Gliales.....	17
Infección del Cultivo Mixto, Neuronas y Células Gliales, con el PoRV.....	17
Detección del PoRV.....	17
Identificación de Neuronas.....	18
Identificación de Células Gliales.....	18
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

## INTRODUCCIÓN

Los eventos iniciales para que una infección se establezca, implican la unión del virus con moléculas presentes en la superficie de la membrana celular (Norkin, 1995). En este mecanismo se involucran las proteínas de la envoltura viral que reconocen a una o varias moléculas receptoras presentes en la membrana de la célula hospedera. Estas moléculas receptoras son de diferente naturaleza química como los fosfolípidos, las proteínas y los oligosacáridos, además entre estas moléculas se forman conjugados como glucoproteínas y glucolípidos que entre algunas de sus funciones sirven como receptores para virus (Lodish, 2000).

El análisis de la función de los carbohidratos en la unión viral es importante, ya que en estudios sobre los receptores celulares para virus, se ha enfatizado el papel primordial de los carbohidratos en dicha unión.

Los virus que invaden el SNC producen diferentes efectos patológicos y manifestaciones clínicas. La susceptibilidad a las infecciones virales varía en las diferentes poblaciones celulares tanto del cerebro como de la médula espinal (Adams y cols., 1997). Esta susceptibilidad se debe a que la célula hospedera posee receptores específicos sobre la membrana.

El Sistema Nervioso Central (SNC) es un blanco para un gran número de infecciones virales. Los principales virus asociados a infecciones virales que afectan al SNC incluyen a los miembros de las siguientes familias: Picornaviridae (enterovirus, coxsackievirus, echovirus), Paramixoviridae (virus del sarampión y virus de la parotiditis), Herpesviridae (virus herpes simplex, citomegalovirus, HHV-6), Togaviridae (virus de la encefalitis equina), Flaviviridae (virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del nilo, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa), Rhabdoviridae (virus de la rabia), Arenaviridae (numerosas especies), Bunyaviridae (virus de la encefalitis de LaCrosse, virus de la encefalitis de California), Reoviridae (coltivirus), Retroviridae (HIV-1, HTLV1) y Papovaviridae (el virus JC) (Johnson, 1998).

Por otra parte la mayoría de los virus no pueden penetrar al SNC presumiblemente por la barrera hematoencefálica, por lo tanto, solo aquellos virus que presentan neurotropismo serán los que tengan el acceso facilitado al SNC (Adams y cols., 1997).

Los poliovirus pertenecen al genero enterovirus de la familia Picornaviridae y pueden causar diversas enfermedades en los humanos, siendo estos los únicos hospederos del virus. Los blancos principales de la infección causada por el poliovirus en el SNC son las motoneuronas del asta anterior de la espina dorsal, el giro prefrontal y el cerebelo (Rueckert, 1996).

La familia Paramixoviridae incluye al virus del sarampión el cual pertenece al genero morbilivirus, la infección causada por este virus continúa siendo una de las principales causas de la mortalidad mundial. (Griffin y Bellini, 1996).

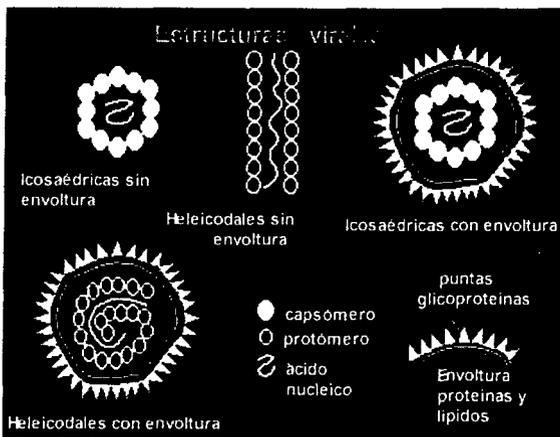
En cerdos neonatos la infección causada por el rubulavirus porcino, miembro de la familia Paramixoviridae, produce signos neurológicos importantes que suelen ser letales. Cuando la infección por este virus ocurre en cerdos de mayor edad las manifestaciones neurológicas son menos severas o bien no se presentan, sin embargo afecta a la función reproductiva (Stephano-Hornedo, 1983).

## ANTECEDENTES

### Virus.

Los virus son de una composición estructural simple y varían ampliamente en apariencia; algunos presentan formas muy complejas semejantes a esferas con espinas o módulos de aterrizaje lunar. Las superficies de los virus se encuentran cargadas debido a la presencia de grupos funcionales de aminoácidos. En la superficie exterior de los virus existen sitios receptores que se encuentran altamente adaptados para reconocer células hospederas específicas adecuadas para inducir el crecimiento de un virus particular.

Debido a estos receptores, los virus son ampliamente específicos a ciertas especies, aunque una pequeña cantidad de virus han demostrado cruzar la barrera de las especies y brincar de hospederos animales a hospederos humanos (Reynolds, 2003).



Reynolds, 2003.

Los virus sin envoltura se adsorben sobre la superficie celular mediante adhesinas e inducen su propia fagocitosis. Cuando la vacuola fagocítica se acidifica, el virus pierde la cubierta y el ácido nucleico viral entra al citoplasma de la célula (viropexis). Los virus con envoltura entran también por viropexis, pero la nucleocápside escapa del fagosoma cuando la envoltura viral se funde con la membrana del fagosoma. Otros virus con envoltura entran a la célula cuando la envoltura viral se funde con la membrana celular. (León, 2003)

Al momento en que una partícula viral se adsorbe a una proteína de membrana específica de la célula hospedera, ésta, la incorpora en un endosoma. Una proteína de la membrana del endosoma bombea protones del citosol hacia el interior del endosoma. Posteriormente se da un cambio de la conformación de la glucoproteína viral, que conduce a la fusión de la cubierta viral con la bicapa lipídica del endosoma y la liberación de la nucleocapside en el citosol. Se replica el genoma RNA viral y se sintetizan mRNA virales. Uno de los mRNA virales codifica la glucoproteína transmembranal (Knipe, 2001).

### **Receptores.**

La unión del virus con una célula hospedera se realiza a través de una proteína viral o anti-receptor que se une a un receptor de superficie celular.

Un ejemplo clásico de este proceso es el anti-receptor de hemaglutinina de virus de la influenza. Otro anti-receptor ampliamente estudiado es la glucoproteína de envoltura gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Los virus complejos como el “pox-virus” por ejemplo (que son los virus relacionados a la viruela y el herpes virus) pueden tener más de un anti-receptor. La expresión o ausencia de un receptor en la superficie, en gran parte, determina el tropismo de la mayoría de los virus (el tipo de célula donde son capaces de replicarse), que es un factor importante en la patogénesis. La gran mayoría de los receptores celulares son glucoproteínas (Heaphy, 2004).

### **Oligosacáridos N-ligados y O-ligados.**

La glucosilación es una modificación post-traduccional importante y frecuente. En este proceso, los oligosacáridos se unen de manera covalente a las proteínas para formar glucoproteínas. Existen numerosas glucoproteínas en los organismos, las cuáles se involucran en casi todo los procesos biológicos. Dichas glucoproteínas pueden actuar como: enzimas, proteínas de transporte, receptores, hormonas y proteínas estructurales. La mayoría de las proteínas que se sintetizan en el retículo endoplásmico son sujetas a la glucosilación. (Zmuda-Trzebiatowska, 1997).

Las estructuras de los oligosacáridos N-ligados y O- ligados son muy diversas y en cada tipo suelen encontrarse residuos de sacáridos diferentes.



En todos los **oligosacáridos N-ligados**, la N-acetilglucosamina se une al nitrógeno amídico de la asparagina y contiene manosa y N-acetil-glucosamina, y pueden tener varias ramificaciones que terminan con una o más moléculas de residuos de ácido siálico.

Los **oligosacáridos O-ligados** están unidos a un grupo hidroxilo de una serina o treonina mediante la N-acetilgalactosamina o al grupo hidroxilo de la hidroxilisina a través de la galactosa. Los oligosacáridos O-ligados cortos con frecuencia solo contienen de uno a cuatro residuos de carbohidratos (Lodish, 2000; Zmuda-Trzebiatowska, 1997).

### **Ácido Siálico.**

El ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico, NeuAc) es uno de los componentes moleculares que conforma a los oligosacáridos. Forma una familia de más de veinte derivados naturales. De estos derivados se pueden tener uno o varios residuos en la misma molécula, lo que le confiere una gran variedad. Los diferentes tipos de ácido siálico son derivados del ácido neuramínico, y estos se encuentran generalmente en la posición terminal de las cadenas oligosacáridas en la superficie de las células y se involucran en diversas funciones biológicas de gran importancia (Suryanti, 2002).

Cuando el ácido siálico se une a otros residuos de carbohidratos de la membrana celular, con frecuencia lo hace a la galactosa o a la N-acetil galactosamina y raramente a la N-acetilglucosamina o al mismo ácido siálico. Esto confiere una gran variabilidad la cual depende hasta de la posición de un solo carbohidrato. Esta alta variabilidad resulta en implicaciones biológicas importantes que están determinadas en los diferentes tipos de células, así como sus diferencias funcionales o de desarrollo (Traving y Schauer, 1998; Lodish y cols., 2000).

### **Rubulavirus porcino.**

El rubulavirus porcino (PoRV) es capaz de infectar al sistema nervioso central, este virus pertenece a la familia Paramixoviridae y al género Rubulavirus (Rima y cols., 1995). En análisis moleculares se encontró que el PoRV está estrechamente relacionado con el virus de la parotiditis (Sundqvist y cols., 1990).

El PoRV produce una enfermedad infecto-contagiosa que se desarrolla en cerdos. Desde que se identificó por primera vez, a principios de los ochenta del siglo pasado, se ha logrado un avance importante en el conocimiento de las características moleculares del virus y las propiedades biológicas e inmunológicas de la enfermedad (Hernández y cols., 2004). En México los primeros brotes se presentaron en la región porcícola de La Piedad Michoacán, diseminándose a otros estados del país ya que no se efectuaron medidas sanitarias adecuadas (Campos y cols., 1982, Stephano-Hornedo y cols., 1988, Stephano-Hornedo y cols., 1992).

### **Características del rubulavirus porcino.**

El PoRV posee dos glucoproteínas en su envoltura: la proteína hemaglutinina-neuraminidasa de 66kDa la cual tiene la propiedad de aglutinar los eritrocitos de diferentes especies y tiene actividad neuraminidasa, con lo cual libera ácido siálico después de interactuar con sus receptores y la proteína de fusión de 59kDa la cual realiza la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula hospedera y en consecuencia la formación de sincitios.

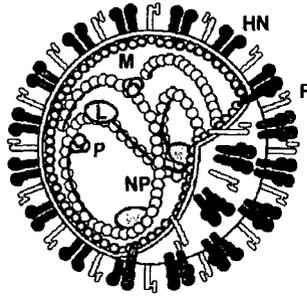
El PoRV tiene cuatro proteínas internas que no participan directamente en la adhesión y penetración del virus nuevo, pero si intervienen en el proceso infeccioso y formación del virus nuevo, dichas proteínas se han clasificado de la siguiente manera:

- Proteína de matriz, la cual funciona como puente de enlace entre las proteínas de la envoltura viral y la nucleocapside.
- Nucleoproteína, se encuentra recubriendo el ARN viral y le da una simetría helicoidal.
- Fosfoproteína
- Proteína de Alto Peso Molecular

Estas últimas dos proteínas participan en la replicación del virus. (Sundqvist y cols., 1990; Berg y cols., 1992).

La nucleoproteína, la fosfoproteína y la proteína de alto peso molecular, se encuentran asociadas al genoma viral; mientras que la proteína de matriz, y las glucoproteínas hemaglutinina-neuraminidasa y las de fusión se localizan en la membrana viral (Reyes-Leyva, 2002).

HN: glucoproteínas hemaglutinina-  
neuraminidasa  
F: glucoproteína de fusión  
M: proteína de matriz  
NP: nucleoproteína  
P: fosfoproteína  
L: proteína de alto peso molecular



Reyes-Leyva., 2002.

### Datos Epidemiológicos.

La distribución de la enfermedad se analizó mediante la detección de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación. En un estudio que se llevo a cabo de 3,754 muestras serológicas provenientes de 23 estados de México (71.87% de la extensión del país), 833 muestras fueron positivas, siendo el 22.18% distribuidos en 10 estados correspondientes principalmente a la zona Centro del Bajío y menor grado en la Península de Yucatán y al sureste del país.

Con base a la información anterior se detectaron anticuerpos contra el rubulavirus porcino en mas del 30% del territorio nacional, esto indicó una difusión extensa que aun puede aumentar si no se limita su diseminación (Carreón, 1994).

### **Sintomatología.**

En los cerdos neonatos la infección con el PoRV produce signos neurológicos que se caracteriza por coordinación motora deficiente, debilidad, rigidez de miembros posteriores, temblores, marcha rígida, postración, hiperexcitabilidad, movimientos en marcha, letargia, ceguera, movimientos rítmicos involuntarios de los ojos, convulsiones y muerte (Stephano-Hornedo, 1983). En hembras adultas causa infertilidad, momificación de fetos, retorno a estro, partos con mortinatos, anorexia, depresión, letargia y aborto. En machos adultos causa, orquitis tanto unilateral como bilateral, atrofia de los testículos reduciendo su tamaño, epididimitis bilateral a nivel de cabeza con formaciones quísticas y baja motilidad espermática (Ramírez-Mendoza y cols., 1997).

### **Histopatología.**

El PoRV puede infectar diferentes órganos del cerdo: bazo, riñón, hígado, ganglios mesentéricos, amígdalas. En cerdos neonatos infectados con el virus en forma natural infecta a células neuronales de corteza cerebral, cerebro medio y cerebelo causando *status spongiosus* del neuropilo, afectando tanto a sustancia gris como blanca, alteración en el patrón de migración, así como neuronofagia, cariólisis, gliosis, necrosis y muerte celular (Ramírez-Herrera, 1993).

En el 10% de los cerdos infectados se muestra opacidad cornea, presentando depósitos amiloides probablemente debido a reacciones antígeno-anticuerpo en las células de la cornea. (Stephano-Hornedo y Gay-Gutiérrez, 1985), en estudios histológicos de estas muestras se observan macrófagos y neutrófilos en la capa interna de la cornea.

En estudios con cerdos neonatos infectados tanto en forma natural como experimental se detectó por inmunocitoquímica, la presencia de este virus, el cual se incorporó a las neuronas después de unirse a moléculas receptoras de la mucosa olfatoria, bulbo olfatorio, corteza entorrinal, giro parahipocampal, hipocampo y corteza cerebral. En este estudio se propusieron las rutas de infección natural utilizadas por este PoRV. (Ramírez-Herrera y cols., 1997).

El cerdo es la única especie en la que se ha detectado la enfermedad en forma natural, aunque experimentalmente ha sido posible infectar a ratones, conejos y embriones de pollo (Martínez-Lara, 1991; Ramírez-Herrera, 1993).

El efecto citopático del PoRV se produce de forma similar a otros paramixovirus, como el provocado por el virus de sarampión, parainfluenza, parotiditis, newcastle y distemper.

El PoRV produce infección y efecto citopático en diferentes líneas celulares como PK-15 (riñón de cerdo), TB (turbinazas de bovino) y MDBK (riñón de hamster sirio) en donde se presenta muerte celular, cambio de morfología, cuerpos de inclusión citoplásmicos eosinofílicos, formación de sincitios y megacariocitos por fusión celular, necrosis y destrucción de hasta un 80% de la monocapa de la células (Ramírez-Herrera, 1993). Por otra parte, se observó que éste virus infecta a cultivos primarios de fibroblastos de embriones de pollo y los efectos que produce son pérdida en la morfología normal y una forma redonda de las células, vacuolización citoplásmica, cuerpos de inclusión citoplásmicos eosinofílicos, fusión celular, sincitios, degeneración y muerte celular. (Ramírez-Herrera, 1993).

### **Moléculas Receptoras al PoRV.**

Los paramixovirus poseen dos tipos de glucoproteínas insertadas en la envoltura lipídica. Estas son: La hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F), la primera usualmente media la unión de los viriones con las moléculas receptoras sializadas de la membrana de la célula hospedera y también tiene actividad de destrucción del receptor (neuraminidasa). La segunda proteína es la que media la fusión de la envoltura del virión con la membrana plasmática de la célula hospedera (Wild y cols., 1991).

En estudios realizados por Reyes-Leyva se mostró que la preincubación del virus con oligosacáridos que contienen ácido siálico unido en forma de  $\alpha$ 2,3 a lactosa inhibe la unión del virus en células Vero (riñón de mono), esto sugiere que las moléculas glucoproteicas sializadas podrían servir como receptores para este virus (Reyes-Leyva y cols., 1993).

En estudios previos de VOBPA (ensayo de unión de virus sobrepuesto) se ha observado que el PoRV es capaz de unirse a una glucoproteína de aproximadamente 116 kDa presente en las membranas de las células neuronales. Esta glucoproteína posee residuos de ácido siálico en una cadena oligosacárida N-ligada. Además se detectó que ésta glucoproteína se unió a membranas celulares de cerdos recién nacidos, a 60 días de edad y

adultos, y se observó que la intensidad de la señal de unión PoRV a ésta glucoproteína es aparentemente mayor en cerdos neonatos que en cerdos adultos. El tratamiento con N-glucosidasa F, que elimina los oligosacáridos N-ligados que regularmente son sialidados, produjo una disminución significativa de la unión del RPEOA hacia la proteína de 116 kDa. (Mendoza-Magaña y cols., 2001).

## JUSTIFICACIÓN

Es importante estudiar las moléculas de la membrana celular que pueden funcionar como receptores virales, para entonces conocer los mecanismos iniciales por los cuales los virus infectan a la célula hospedera.

Por lo cual resulta interesante estudiar la capacidad de infección de éste virus en cultivo de las células neuronales y gliales, de cerdo neonatos, para de esta forma determinar si el tratamiento a estas células con diferentes enzimas afecta la capacidad de infección por éste virus. También resulta esencial estudiar el papel de las proteínas de superficie del virus, hemaglutinina-neuraminidasa y la proteína de fusión en el reconocimiento del receptor hacia las células neuronales y gliales.

## **HIPÓTESIS**

Los oligosacáridos N-ligados en células neuronales y células gliales son receptores para las proteínas hemaglutinina-neuraminidasa y la proteína de fusión en la infección por el PoRV.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Valorar si el ácido siálico y los oligosacáridos N-ligados en células neuronales y gliales son importantes para la infección causada por el PoRV.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Analizar en cultivos de células neuronales y gliales de cerdos recién nacidos, el efecto de la exposición al PoRV en la corteza, hipocampo y cerebelo.
- 2.- Estudiar en las células neuronales en cultivo, la participación de los carbohidratos N-ligados y de las glucoproteínas en la infección del virus.
- 3.- Determinar la participación de las proteínas hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y (o) la proteína de fusión (F) en la infección a las células neuronales del cerdo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Obtención del virus.**

Se cultivaron células de la línea celular PK-15 para la obtención el virus, de acuerdo a la metodología descrita por (Mendoza-Magaña y cols., 2001).

### **Anticuerpos policlonales contra PoRV.**

Los anticuerpos contra el PoRV se obtuvieron según lo describió Ramírez-Herrera y cols., 1997.

### **Preparación de anticuerpos contra las proteínas de envoltura viral hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) del PoRV.**

Los anticuerpos contra las proteínas de la envoltura viral HN y la F, se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita por (Mendoza-Magaña y col., 2001).

### **Soluciones y amortiguadores.**

#### **1.- Solución de Hank's con tripsina (HT).**

Se preparó la solución de Hank's libre de calcio y magnesio, se adicionó tripsina al 0.2%, HEPES 10mM, albúmina bovina al 0.6%, sulfato de magnesio al 0.038%, y D-glucosa al 0.6% (Barnes y cols., 1994).

#### **2.- Amortiguador de fosfatos (PBS).**

Se preparó una solución de fosfato de sodio monobásico 0.2M (27.8g/1000ml) y otra solución de fosfato de sodio dibásico 0.2M (53.65g/1000ml). Se diluyó 190ml de la primera solución en 810ml de la segunda solución a pH 7.3.

#### **3.- Amortiguador con antibióticos y glucosa (AAG).**

Se preparó con PBS 0.1M al que se adicionó D-glucosa al 3% y gentamicina 300µg/ml con un pH 7.2.

#### **4.- Amortiguador de tris salino mas triton (TTBS)**

Esta solución se preparó de la siguiente forma: se utilizó de Tris Cl 10mM mas NaCl 150mM a pH 8, mas 0.05% de triton.

#### 5.- Amortiguador de tris salino mas albúmina sérica bovina (TBSA).

Este amortiguador se preparó con Tris Cl 10mM, NaCl 150mM a pH 7.4, más albúmina sérica bovina al 3%.

#### 6.- Preparación de la poly-L-lisina en amortiguador de borato.

La poly-L-lisina (peso molecular de 30,000 a 70,000, Sigma Chemical Co.) se diluyó en agua destilada dejando una concentración de 1 mg/ml y se almacenó en alícuotas de 1 ml.

Posteriormente, se preparó el amortiguador de borato con bórax 0.15M a pH 8.4, y se esterilizó en autoclave. En éste amortiguador se diluyó las alícuotas de poli-L-lisina dejando una concentración final de 0.1 mg/ml antes de su uso.

#### 7.- Solución de azul de tripano.

La solución se preparó con 400 mg del colorante agregando 100 ml de PBS a pH de 7.2. Se prepararon alícuotas de 90 µl y se almacenaron hasta su uso.

#### 8.- Solución de revelado DAB.

La solución se preparó con TrisCl 0.01M, pH 7.6, 1 ml de cloruro de magnesio al 0.03%, 6 mg de tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) y 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30%.

### **Obtención Neuronas y Células Gliales.**

Las células neuronales de las regiones de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo se obtuvieron de cerdos recién nacidos, procedentes de la Posta Zootecnica Cofradía de la Universidad de Guadalajara, ya que estos animales se encontraban libres de esta infección, determinada en base a la presencia de anticuerpos contra PoRV.

### **Preparación de las Placas de Cultivo.**

Se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos para los cultivos celulares. El fondo de las cajas se recubrió con gelatina al 0.025% durante un periodo de 30 minutos. Después se retiró la gelatina y se recubrieron con poli-L-lisina e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavo por 5 veces con PBS 0.1M pH 7.2 y finalmente se hicieron 5 lavados con agua estéril. Las cajas de cultivo se expusieron durante 2 horas bajo luz ultravioleta para evitar la contaminación bacteriana. Finalmente las cajas preparadas se mantuvieron en la incubadora a 37°C hasta su uso.

### **Cultivo Celular de Neuronas y Glia (Cultivo Mixto).**

Los cerdos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35mg/ Kg) una vez anestesiados se decapitaron. La cabeza se colocó en etanol al 70% durante tres minutos y el cerebro fue asépticamente extraído y colocado en buffer de fosfatos frío con antibiótico gentamicina (300µg/ml). Se eliminaron las meninges de cada una de las regiones corteza cerebral (cx), hipocampo (h) y cerebelo (cb). Enseguida, el tejido se cortó en pequeños trozos y se disgregó en solución de Hanks y tripsina, se incubó a temperatura ambiente con agitación continua durante 5 minutos, se eliminó la tripsina y se detuvo la actividad de esta al adicionar suero fetal bovino (SFB), enseguida se realizó una disgregación mecánica con pipetas Pasteur. Posteriormente se determinó la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripano. Las células fueron colocadas en 24 posillos previamente tratados con poli-L-lisina, se sembraron  $3 \times 10^5$  células por posillo, enseguida las células de la corteza cerebral y el hipocampo fueron diluidas en D-MEM F-12 suplementado con glucosa 25mM, L-glutamina 4mM, HEPES 50mM, con pH de 7.3, antibiótico (gentamicina 150 µg/ml) y SFB al 20%. Las células de cerebelo fueron diluidas con D-MEM F-12 suplementado con glucosa 25mM, L-glutamina 4mM, HEPES 50 mM, cloruro de sodio 5mM, pH 7.2 y antibiótico (gentamicina 150 /ml) y suero de caballo (SC) al 20%, posteriormente se incubaron a 36°C con CO<sub>2</sub> al 5% y humedad constante. Se cambió el medio a las 24hrs de ser sembradas las células, y se incubaron hasta su diferenciación del 3° y 5° día para las neuronas, y 12 al 15 días para las células gliales.

### **Cultivo de Neuronas.**

Para la obtención del cultivo puro de neuronas y eliminar las células gliales, se procedió de la siguiente forma: después de 24 horas de incubación, se agregó citosina-1B-D arabinofuranosido (C-Ara) (Ginham y cols. 2001) 10mM diluida en D-MEM más SFB o SC según la región, este medio se adicionó a las células neuronales y fueron incubadas durante 24 horas. Posteriormente a esta incubación, el medio con C-Ara se eliminó y se sustituyó por medio nuevo con SFB o SC según el caso, y se incubó hasta que se observó la diferenciación de las neuronas.

### **Cultivo de Células Gliales.**

El cultivo de células gliales inició con el cultivo mixto antes mencionado, en este caso se sembró  $6 \times 10^5$  células por pozo y fueron incubadas durante 2 horas. Posteriormente se retiró el medio el cual contenía las células que no se adhirieron, para de esta forma eliminar la mayor cantidad de neuronas y obtener la mayor proporción de células gliales. Enseguida se les adicionó medio nuevo como se indicó previamente para cada una de las regiones, y estas células fueron incubadas hasta su diferenciación a los 13 días aproximadamente.

### **Infección del Cultivo Mixto, Neuronas y Células Gliales, con el PoRV.**

Una vez que las células neuronales se diferenciaron se expusieron al PoRV, a una concentración de  $30 \mu\text{g}$  de proteína viral/ml, en el D-MEM F-12 y se incubaron a  $36^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Posteriormente se eliminó el virus, se lavaron las células con PBS estéril y se incubaron con medio nuevo durante 24 horas. A continuación se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 1 hora, enseguida este se eliminó y se precedió a lavar con PBS 0.1 M y pH de 7.2. Posteriormente se realizó el estudio de inmunocitoquímica para detectar si PoRV infecta a células neuronales o gliales.

### **Detección del PoRV.**

Con el fin de observar la infección del PoRV tanto en las neuronas como en las células gliales se realizó la metodología de inmunocitoquímica de la siguiente forma:

Se procedió a permeabilizar las células con TTBS a  $4^\circ\text{C}$  durante 18 horas. A continuación se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.5% durante 30 minutos.

Las células se incubaron con anti-PoRV 1:100 durante 18 horas a  $4^\circ\text{C}$ , enseguida se lavaron con PBS cinco veces. Las células después se incubaron durante 18 horas con suero normal de cabra al 10% en PBS con un 0.1% de azida de sodio. A continuación las células se incubaron con un IgG anti-cerdo hecho en conejo marcado con peroxidasa.

La inmunoreactividad se visualizó con la solución de revelado DAB. La reacción se detuvo con agua destilada, posteriormente las neuronas se montaron con cubreobjetos y glicerina 1:1 en PBS pH 9.

### **Identificación de Neuronas.**

Una vez que las células neuronales alcanzaron su diferenciación morfológica y se infectaron, se procedió a identificarlas por medio del método inmunocitoquímico de la siguiente manera:

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, lavadas, permeabilizadas y expuestas a tripsina. Después se incubaron con el anticuerpo anti-MAP-2 diluido 1:250 en PBS con albúmina sérica bovina al 1% y se incubaron a 4°C durante 18 horas. A continuación se realizaron 4 lavados con PBS y un lavado con TTBS. Enseguida, las neuronas se incubaron por 18 horas con suero normal de cabra al 10% disuelto en PBS a 4°C. Posteriormente se procedió a realizar los lavados. Después se incubaron con anti-IgG de ratón hecho en cabra marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluido 1:200 en TBSA, se incubó a 4°C durante 2 horas, posteriormente se lavaron. A continuación, se realizó la detección inmunocitoquímica del PoRV como se describió anteriormente, las células se recubrieron con glicerina 1:1 en PBS, pH 9. Para observar el anticuerpo marcado con fluorescencia, se utilizó un microscopio con un sistema de fluorescencia y se tomaron fotografías de las células inmunoreactivas MAP-2 y para el PoRV.

### **Identificación de Células Gliales.**

Una vez que se estableció el crecimiento de células gliales se procedió a su fijación, permeabilización y se bloqueó de la peroxidasa endógena. Las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal IgG anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial) hecho en conejo, se diluyó 1:250 en la solución TBSA se incubó durante 18 horas a 4°C. Al término de la incubación se realizaron lavados como se describió anteriormente. Posteriormente, las células se incubaron durante 18 horas a 4°C con suero normal de cabra al 10% diluido en PBS. Enseguida se procedió con los lavados, y después se incubaron por 1 hr. con anti-IgG de cabra marcado con biotina (1:500 en TBSA), a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron con extravidina-peroxidasa (1:1000) en PBS, durante una hora a temperatura ambiente. Para el revelado se usó la solución de revelado DAB. Las células se expusieron durante 15 minutos a esta solución. La reacción se observó de color café, y la reacción se detuvo con agua destilada.

### **Cultivo de Células Neuronales Tratadas con Enzimas e Inyectadas.**

Para analizar la acción que ejercen los residuos de carbohidratos en la infección del PoRV sobre las células neuronales, estas se trataron con enzimas para eliminar los residuos de carbohidratos, y de esta forma poder examinar su capacidad de infección del virus.

Una vez que se diferenciaron las células neuronales fueron tratadas con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (20 mU/mg ) diluida en PBS pH 5.6 para eliminar el ácido sialico, las cuales fueron incubadas a 36° C durante 2 horas. El exceso de la enzima se eliminó con lavados de PBS pH 7.2 frío. Posteriormente las células se incubaron con el PoRV (30µg de proteína viral/ml) a 36°C durante 1 hora. Enseguida se eliminó el virus y se agregó el medio de cultivo nuevo suplementado con SFB al 20%. Esto se realizó en los cultivos de corteza cerebral e hipocampo. En los cultivos de cerebelo suplementado con 20% de suero de caballo y se incubaron por 24 hrs. Después se fijaron, permeabilizaron, y se bloqueó la peroxidasa endógena de los cultivos, para posteriormente realizar la detección inmunocitoquímica contra el PoRV como se describió anteriormente.

Otros cultivos neuronales fueron expuestos a N-glucosidasa F (1U/mg en PBS pH 8.6). Después del tratamiento enzimático, se lavaron con PBS frío, y se expusieron a PoRV por 1 hr a 36°C, posteriormente se eliminó el virus con lavados de PBS, y las células fueron incubadas con medio nuevo por 24 horas a 37°C. Posteriormente las células se fijaron, se permeabilizaron, y se bloqueó la peroxidasa endógena para posteriormente realizar el estudio inmunocitoquímico contra PoRV como se describió con anterioridad.

### **Anticuerpos policlonales Anti-HN o Anti-F.**

Para identificar si la proteína HN o F o ambas proteínas del PoRV son indispensables para conferir al virus la capacidad de infectar a las células neuronales, el virus se preincubó con anticuerpos policlonales de ratón contra cada una de estas proteínas de la envoltura viral.

Una vez morfológicamente diferenciadas las células neuronales de las regiones utilizadas, el virus se preincubó con anticuerpos contra la proteína HN ó contra la proteína F (diluido 1:100 en una suspensión de virus a una concentración de proteína viral 30 µg/ml) durante 30 minutos a 36°C. Las células se expusieron al virus preincubado con los anticuerpos descritos anteriormente durante una hora a 36°C. El exceso de virus se eliminó

mediante lavados con medio de cultivo y luego las células se incubaron por 24 horas a temperatura de 36°C en medio de cultivo. Enseguida se realizó la detección inmunocitoquímica del PoRV, como se describo anteriormente.

### **Mediciones.**

Se realizaron calibraciones individuales, para realizar la medición de la densidad óptica de los cultivos para cada uno de los grupos experimentales así como de los grupos controles. Esto se realizó utilizando el sistema de imágenes Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

### **Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico de células inmunoteñidas se utilizó un valor de  $n > 20$  en estudios independientes.

A los resultados de los ensayos de la infección con PoRV en células neuronales tratadas con enzimas, y los resultados obtenidos de los ensayos de infección con PoRV preincubado con anticuerpos anti-HN y (o) anti-F en células neuronales se realizó el análisis estadístico por la prueba de ANOVA y como prueba post-hoc se utilizó la prueba de Tukey y Scheffe, tomando el valor de  $p < 0.05$  como un valor estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### **Cultivo mixto de células neuronales infectadas con PoRV.**

Para saber si el PoRV es capaz de infectar neuronas, células gliales o ambas, se realizaron cultivos mixtos, de células gliales y cultivos de neuronas. Con el fin de identificar a las neuronas y a las células gliales, se identificaron a las proteínas del citoesqueleto propia de cada una: que para las neuronas fue MAP-2 (proteínas asociadas a microtubulos) y para células gliales GFAP (proteína ácida fibrilar glial).

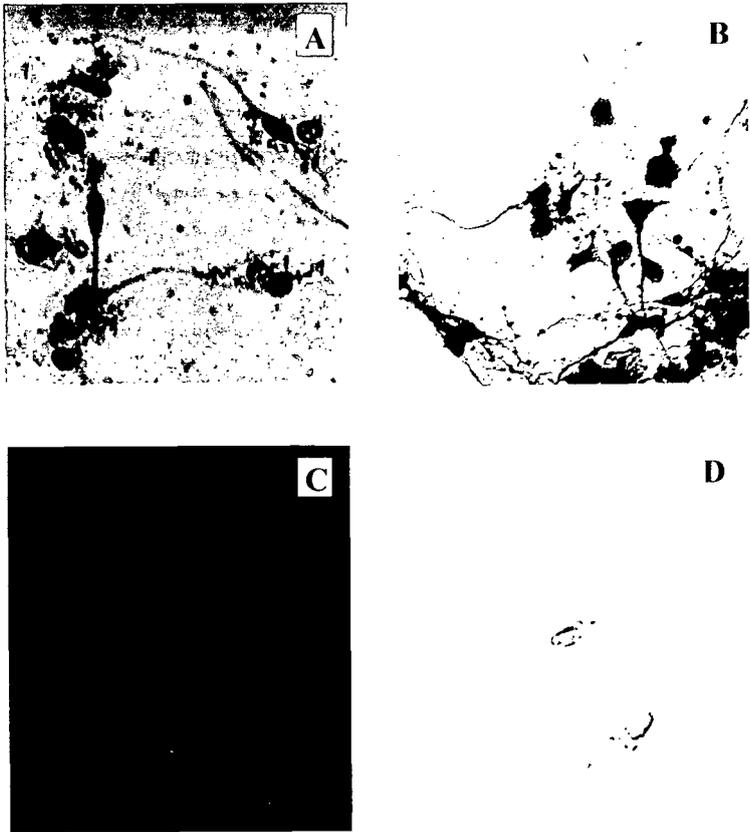
En estos experimentos encontramos que el PoRV fue capaz de infectar las células tanto en los cultivos mixtos, cultivos de las células gliales, así como los cultivos enriquecidos de neuronas, ya que las células fueron inmunopositivas al ser reveladas con diaminobenzidina (Fig. 1A).

La figura 1B muestra células identificadas con anti-GFAP las cuales fueron marcadas como células gliales, las que además mostraron inmunoreactividad positiva al PoRV.

La figura 1C muestra los cultivos de neuronas en los cuales se observó que las células fueron positivas a MAP-2 y se identificaron como inmunofluorescentes, de la misma forma presentaron inmunoreactividad al PoRV con marcaje por inmunoperoxidasa (Fig. 1D).

Por lo tanto, el PoRV es capaz de infectar tanto células gliales como neuronas en cultivo y células en cultivo mixto. Además, la exposición al PoRV en las células neuronales en cultivo no afectó la expresión de las proteínas MAP-2 y GFAP durante el periodo que duró el ensayo.

**Cultivo mixto de células neuronales infectadas con PoRV.**



**Figura 1.**

**A.-** Se observan células neuronales de diferentes tipos (cultivo mixto) las cuales presentaron una reacción positiva al PoRV.

**B.-** Se observan células GFAP positivas, las cuales también presentan inmunoreactividad a la infección por el PoRV.

**C y D.-** Se observan neuronas inmunoreactivas a MAP-2, las cuales también son positivas a la infección por el PoRV.

### **Infección de cultivos de células neuronales tratadas con enzimas**

Con el fin de analizar la participación de los residuos de ácido siálico y los residuos de carbohidratos N-ligados presentes en las células neuronales de cultivos mixtos en la infección con el PoRV, se eliminaron los residuos de ácido siálico de la membrana de las células neuronales con neuraminidasa.

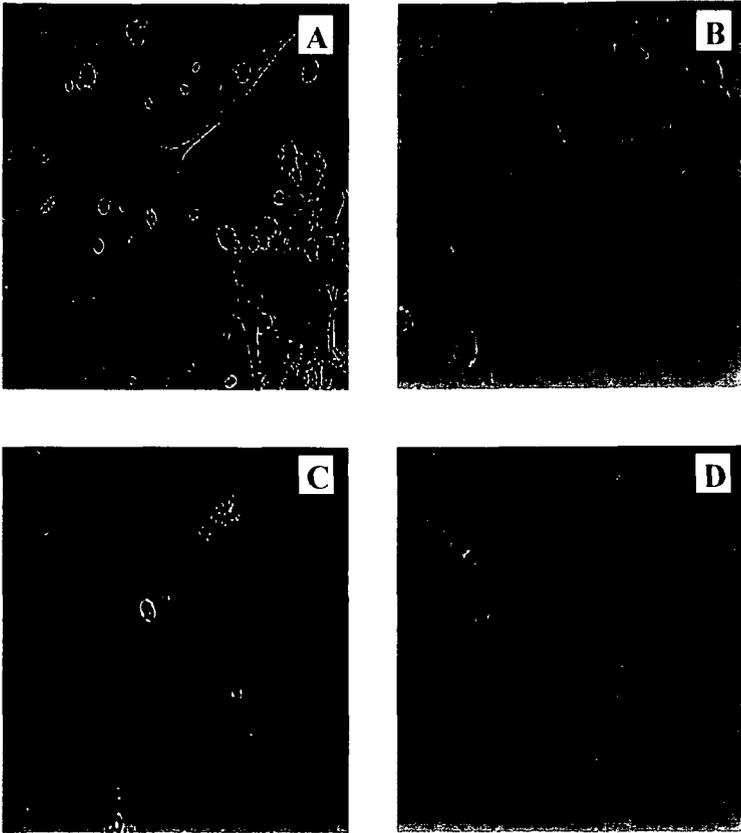
En la figura 2 A se muestra la inmunodetección de peroxidasa positiva del PoRV en un cultivo mixto infectado, el cual corresponde al control positivo para este ensayo. El control negativo (figura 2 B) muestra la inmunoreacción negativa al PoRV en un cultivo mixto no infectado.

En la figura 2 C se observa una disminución de la infección en las neuronas de cultivos mixtos previamente tratadas con neuraminidasa, y enseguida expuestas al PoRV. De manera similar, las células tratadas con N-glucosidasa F (figura 2 D) mostraron una severa disminución en la infección por el virus, ya que no hay detección inmunocitoquímica.

Los residuos de ácido siálico presentes en cadenas oligosacáridas N-ligadas son importantes para la infección por el PoRV en las células neuronales en cultivo.

En la figura 3 se muestra la cuantificación de la señal de inmunoreactividad a la infección, la cual se expresa en porcentaje en las células neuronales. El valor de la señal de infección en el grupo control negativo fue de  $9.98\% \pm 4.9\%$  ( $n=20$ ,  $p<0.001$ ) con respecto al valor correspondiente al control positivo. Las células que fueron tratadas con neuraminidasa presentaron una disminución de la señal de infección que corresponde a  $9.1\% \pm 5.0$  ( $n= 20$ ,  $p<0.001$ ) con respecto al valor del control positivo. Las células que recibieron tratamiento con N-glucosidasa F mostraron disminución de la señal de infección  $8.6\% \pm 3.8\%$  ( $n=20$ ,  $p<0.001$ ) con respecto al valor del control positivo.

**Infección de cultivos de células neuronales tratadas con enzimas.**



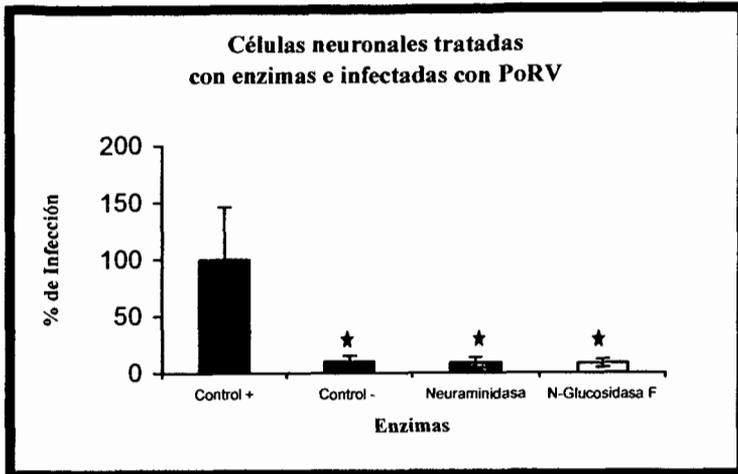
**Figura 2.**

**A.-** Reacción positiva en células neuronales al PoRV.

**B.-** Se observan células neuronales no infectadas las cuales no presentan inmunoreactividad.

**C.-** Células neuronales tratadas con neuraminidasa las cuales fueron negativas a la reacción con inmunoperoxidasa.

**D.-** Inmunodetección negativa al PoRV en células neuronales cerebelosas tratadas con N-glucosidasa F.



**Figura 3.**

En el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de infección del virus. En el eje de las abscisas se muestran los diferentes tratamientos enzimáticos. El control positivo se observa con un 100% de infección. Se muestra una diferencia estadísticamente significativa (\* $p < .001$ ) en el control positivo con respecto a los otros grupos tratados con enzimas y al control negativo.



### **Cultivo mixto de células neuronales infectadas con PoRV preincubado con anticuerpos anti-HN y(o) anti-F.**

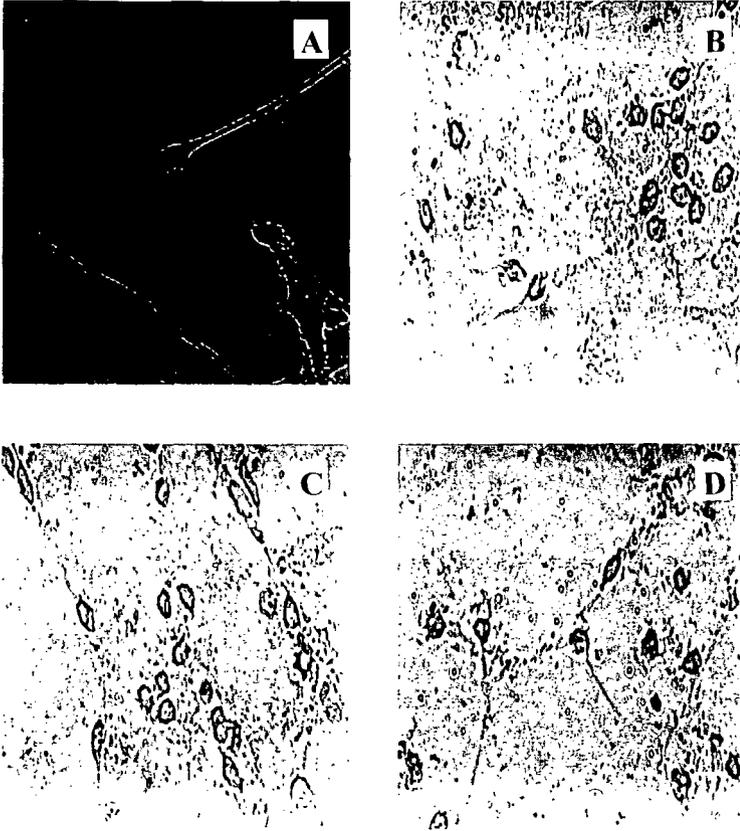
Los siguientes estudios se realizaron para analizar la participación de las proteínas de superficie HN y F del PoRV para el establecimiento de la infección en las células neuronales.

En la figura 4 A se muestra la inmunodetección del PoRV en el cultivo mixto de células neuronales, las cuales fueron expuestas a virus no preincubado con anticuerpos, la señal obtenida por inmunocitoquímica correspondió al control positivo a infección por el PoRV.

En la figura 4 B se observa que las células neuronales expuestas al virus preincubado con anticuerpos anti-HN disminuyó la inmunoreactividad al PoRV. Paralelamente en la Figura 4 C se observa una disminución en la inmunodetección del PoRV en las células neuronales expuestas al virus preincubado con anticuerpos anti-F. En la Figura 4 D se observa la inmunoreactividad de la infección en las células expuestas al virus preincubado con ambos anticuerpos (anti-HN y anti-F) la cual disminuyó con respecto al control positivo.

En la figura 5 se muestra la cuantificación de la señal positiva a la infección y ésta se expresa en porcentaje en las células neuronales. La señal de infección disminuyó al exponer las células al virus preincubado con anticuerpos. En cultivos infectados con el virus incubado con los anticuerpos anti-F la señal de infección disminuyó hasta un  $8.7 \pm 8.2\%$  ( $n=20$ ,  $p<0.001$ ). En cultivos infectados con el virus incubado con anticuerpos anti-HN la señal de infección disminuyó hasta un  $16.9 \pm 5.5\%$  ( $n=20$ ,  $p<0.001$ ). En cultivos infectados con el virus incubado con anticuerpos anti-F y anticuerpos anti-HN la señal de infección disminuyó hasta un  $21.3 \pm 6.9\%$  ( $n=20$ ,  $p<0.001$ ) con respecto al control positivo.

**Cultivo mixto de células neuronales infectadas con PoRV  
preincubado con anticuerpos anti-HN y(o) anti-F.**



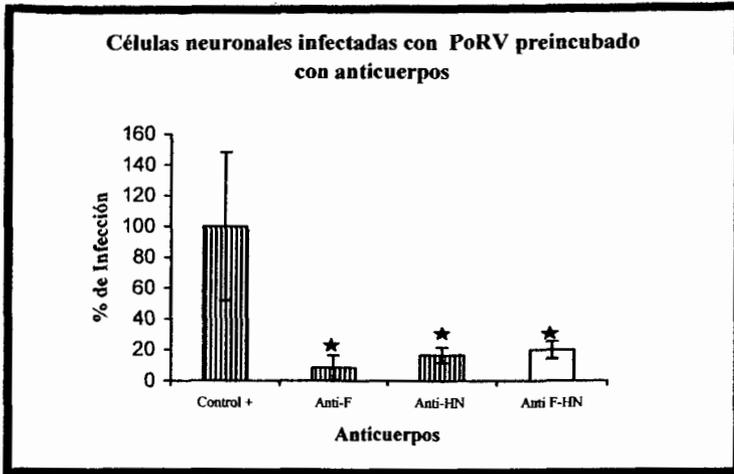
**Figura 4.**

A.- Las células neuronales infectadas con PoRV muestran inmunoreactividad.

B.- Se observa una inmunoreacción negativa en las células expuestas al virus preincubado con anticuerpos anti-F.

C.- Las células expuestas al virus preincubado con anticuerpos anti-HN mostraron una inmunodetección débil.

D.- Se muestran células neuronales expuestas al virus preincubado con anticuerpos anti-HN y anti-F, las cuales presentan una inmunoreacción débil.



**Figura 5.**

En el eje de las ordenadas se encuentra el porcentaje de infección del PoRV. En el eje de las abcisas se ubican los diferentes tratamientos con anticuerpos. El control positivo corresponde al 100% de la infección. Se observa que en las células neuronales con los diferentes tratamientos de anticuerpos, existe una disminución en la infección, estos valores son estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En los cultivos neuronales la infección por el PoRV se detectó por inmunocitoquímica, tanto en cultivos mixtos, cultivo de neuronas y de células gliales de corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. En algunos de los cultivos obtenidos, se observaron células aparentemente fusionadas pero no se observaron cuerpos de inclusión. Sin embargo, en estudios realizados por otros autores muestran que este virus es capaz de producir pérdida de la morfología normal, aglutinación de células, sincitios, fusión célula, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, así como degeneración y muerte celular en diferentes líneas celulares y fibroblastos de embrión de pollo con una incubación no menor de 48hrs. (Martínez y cols., 1991; Berg y cols., 1992, Ramírez-Herrera., 1993; Reyes Leyva y cols., 1993).

Similarmente se ha observado otros virus de la misma familia como el virus del sarampión que infectan células neuronales, en las cuales produce inclusiones intracitoplasmáticas e intranucleares, fusión celular y respuesta inflamatoria, con infiltración linfocítica perivascular (Ter Meulen y Stephenson., 1983, Allen y cols., 1996; McQuaid y cols., 1998).

Los receptores celulares juegan un papel primordial en la unión de un virus a una célula hospedera. La comprensión de las interacciones virales con su receptor es importante para analizar el tropismo viral, diseminación, y la patogénesis, por lo que estas infecciones producen cambios fisiológicos en las células hospederas que conlleva a la sobre expresión de receptores (Schweighardt y cols., 2001).

En estudios previos se analizó la interacción PoRV con moléculas de la membrana celular en células Vero. En estas, la infección es bloqueada o inhibida preincubando el virus con moléculas disacáridas de ácido siálico unido  $\alpha$ 2-3 a lactosa, así como con otras moléculas con alto contenido de residuos de ácido siálico (Reyes-Leyva y cols., 1993). En experimentos anteriores donde se modificó la expresión de los oligosacáridos utilizando inhibidores de la glucosilación, se encontró que el esteroide dexametasona indujo modificaciones en la transcripción de diversos genes, y en relación a la glucosilación, indujo un incremento en la expresión de la  $\beta$ -galactosil- $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa, una enzima que aumenta la expresión en la superficie celular de ácido siálico unido en enlace  $\alpha$ 2,6 a

galactosa (Neu5Aca $\alpha$ 2,6Gal), lo cual en consecuencia disminuye la expresión de su isómero Neu5Aca $\alpha$ 2,3Gal; sin afectar la expresión de la glucoproteína (Reyes-Leyva., 2002).

Las cadenas oligosacáridas de las glucoproteínas juegan un papel importante en la diferenciación y reconocimiento celular. Pueden ser N-ligadas a residuos de asparagina u O-ligadas a residuos de treonina o serina. Existen una gran variedad de inhibidores de la N glucosilación los cuales selectivamente interfieren en los diferentes pasos de la biosíntesis y procesamiento de los oligosacáridos N-ligados, esto es útil para analizar la función y estructura de las glucoproteínas (Keppler y cols., 1994).

En los resultados obtenidos en este trabajo se observó que la eliminación de ácido siálico de la superficie de las células neuronales con neuraminidasa, llevo a una disminución de la infección por este virus. La infección por el PoRV también se disminuyó con la incubación de las células neuronales con N-glucosidasa F, lo cual sugiere que en este tipo de células el receptor expresado contiene una cadena oligosacárida sialidada N-ligada.

Los resultados obtenidos de este trabajo pueden sustentarse con resultados previos donde se realizaron estudios de VOBPA (ensayo de unión de virus sobrepuesto), en los que se sugiere que este virus reconoce en las membranas neuronales de diferentes regiones cerebrales de cerdo una molécula glucoproteica de 116 kDa que contiene residuos de ácido siálico en una cadena oligosacárida N-ligada, la cual sirve para que se pueda unir el PoRV. (Mendoza y cols., 2001).

Esto es consistente con otros resultados publicados donde el reovirus tipo 3 interactúa preferentemente con musina submaxilar bovina que contiene residuos de ácido siálico que presentan bajas concentraciones o que simplemente no presentan residuos de O-acetil (Pacitti y Gentsch, 1987)

Otros virus con envoltura, además de los paramixovirus, como son los coronavirus y los retrovirus que incluyen al virus de la inmunodeficiencia humana, tienen glucoproteínas que median su fusión virus-célula (White, 1990).

El virus de la influenza tiene un sitio de unión a su receptor (que además causa hemaglutinación) al igual que un sitio de actividad de neuraminidasa en la misma proteína hemaglutinina. (Laver y cols., 1984; Hausamany cols., 1993).

Para que la infección por los paramyxovirus se pueda realizar, es necesario que el virus utilice sus dos proteínas de superficie HN (con actividad de hemaglutinación y neuraminidasa) y F (con actividad de fusión) (Morrison y Portner, 1991). En nuestros resultados la incubación del virus con anticuerpos contra cualquiera de estas proteínas virales disminuyó la infección. Por lo tanto, para que suceda la infección es necesario que ocurra la interacción entre la glucoproteína viral HN con su receptor para que enseguida ocurra la activación de la glucoproteína F viral. El virus de la influenza A tiene una glucoproteína con actividad neuraminidasa mientras que la hemaglutinina lleva a cabo funciones tanto de unión como de fusión. (Wiley y Skehel, 1987; Lamb, 1993; White, 1990).

Con los resultados de los estudios anteriores se concluye que el PoRV requiere de sus dos glucoproteínas de superficie para infectar a las células hospederas ya que al preincubar al virus con anticuerpos contra cualquiera de sus dos glucoproteínas éste pierde la capacidad de infectar las células *in vitro*.

Las glucoproteínas de superficie HN y F del PoRV son necesarias para infectar a células hospederas debido a que las preincubaciones del virus contra sus glucoproteínas de superficie HN y F fueron neutralizadas disminuyendo su capacidad de infectar células en cultivo.

La expresión de la NCAM (molécula de adhesión celular) tiene un papel importante en la susceptibilidad al virus de la rabia tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha encontrado que el bloqueo específico o la eliminación de la NCAM reduce significativamente la susceptibilidad celular al virus de la rabia (Thoulouze y cols., 1998).

El receptor glucoproteico que une al PoRV a las células neuronales de cerdo probablemente se trata de una isoforma de las NCAMs, se conoce que presenta una cantidad mayor de residuos de ácido siálico durante la etapa prenatal y neonatal a diferencia de las etapas del desarrollo postnatal en donde disminuye gradualmente durante el desarrollo (Sato y cols. 2000).

Los anteriores hallazgos se pueden confirmar ya que existe una gran variedad de estudios donde se ha encontrado que en cerdos neonatos la unión es mayor que en cerdos adultos siendo que las moléculas sializadas aparentemente son mas abundantes en cerdos

de menor edad (Sato y cols., 2000, Mendoza –Magaña y cols., 2001, Hernández y cols., 2004).

## CONCLUSIONES

- 1.- El PoRV parece ser capaz de infectar neuronas y células gliales en cultivo primario, lo que sugiere que existen moléculas receptoras en ambos tipos de células.
- 2.- El ácido siálico presente en la superficie de las células neuronales de cerdos neonatos es indispensable para que se establezca la infección causada por el PoRV.
- 3.- Los oligosacáridos N-ligados son de gran importancia para que ocurra la infección causada por el PoRV, siempre y cuando estos expresen ácido siálico unido  $\alpha$ 2,3 lactosa.
- 3.- La glucoproteína HN de la envoltura viral del PoRV aparentemente es importante para la interacción con su receptor de la célula hospedera ocurra con una consecuente activación de la glucoproteína F viral, por lo tanto el virus requiere de sus dos glucoproteínas de superficie para iniciar la infección.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams R, Victor M, Ropper A. (1997) Viral infections of the nervous system. Principles of Neurology. Ed McGraw Hill. Chap. 33. pp 742-776.
2. Allen IV, McQuaid S, McMahon J, Kirk J. (1996) The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55: 471-480.
3. Barnes K, Kenny J, Turner A. (1994) Localization of aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV in pig striatum and in neuronal and glial cell cultures. Europ. J. Neurosc. 6: 531-537.
4. Berg M, Hjertner B, Moreno-Lopez J, Linne T. (1992) The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C J.Gen. Virol.199:105-113.
5. Campos ME, Calderón SE, Solorio S. (1982) The blue eye syndrome. Síndrome del ojo azul. Pro of the international pig veterinary society congress México. pp. 171.
6. Carreón NR. (1994) Epidemiología del paramixovirus porcino en México. In first international symposium upon pig paramyxovirus. November. 21-23. pp. 13.
7. Gingham R, Harrison D, Facci L, Skaper S, Philpott K. (2001) Upregulation of death pathway molecule in rat cerebellar granule neuron undergoing apoptosis. Neurosci. Letters. 302 (2-3): 113-116.
8. Griffin DE, Bellini WJ. (1996) Measles virus. In: Fields Virology. Fields B (ed). Lippincott-Raven. Philadelphia. pp1267-1312.
9. Hausman J, Kretzschmar J, Ohuchi M, Garten W, Klenk HD. (1993) N1 neuraminidase of influenza virus A/FPV/Rostock/34 has hemagglutinin activity. Abstract 12<sup>th</sup> Annual Meeting American Society for Virology. pA34.
10. Heaphy, S. (2004) Virus Replication. United Kingdom. <http://www-micro.msb.le.ac.uk/224/Replication224.html>
11. Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. (2004) Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el rubulavirus porcino. Vet. Mex. 35 (1):65-73.

12. Johnson RT. (1998) Viral infections of the nervous system. 2<sup>nd</sup> edition. Lippincott-Raven, Philadelphia. 68 (11): 6993- 7009.
13. Keppler T, Herrmann M, Oppenlander M, Meschede W, Pawlita M. (1994) Regulation of susceptibility and cell surface receptor for the B-lymphotropic papovavirus by N-glycosylation. *J. Virol.* 65(11): 6933-6939
14. Knipe D, Howley P, Lamb, RA. (2001) *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams Wilkins. USA.
15. Lamb RA, (1993) Paramyxovirus Fusion: A Hipótesis for Changes. *Virol.* 197:1-11.
16. Laver WG, Colman PM, Webster RG, Hinshaw VS, Air GM. (1984) Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity. *Virol.* 137:314-323.
17. León R. (2003) *Virología animal. Notas del curso*. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. <http://facultad.usfq.edu.ec/renatol/files/virologianotas3.htm>.
18. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnel J. (2000) Protein structure and function. Protein sorting: organelle biogenesis and protein secretion. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company. Chap. 3, Chap. 17. pp 51-95; 677-743.
19. Martínez-Lara A, Correa-Girón P, Colinas TA. (1991) Síndrome de ojo azul producido por el paramixovirus porcino. *Porcirama*. 12 (177). pp. 35-52.
20. McQuaid S, Campbell S, Wallace IJ, Kirk J, Cosby S L. (1998) Measles virus infection and replication undifferentiated and differentiated human neuronal cells in culture. *J. Virol* 72 (6): 5245-5250.
21. Mendoza-Magaña ML, Ramírez-Herrera MA, JM. Dueñas-Jiménez, Dueñas-Jiménez SH. (2001) Pig paramyxovirus of the blue eye disease binding to a 116kDa glycoprotein expressed in pig neuronal membranes. *J. Vet. Med. B* 48.
22. Morrison T, Portner A (1991). Structure, function, and intracellular processing of the glycoproteins of paramyxoviridae. In: *The Paramyxoviruses*. DW Kingsbury Ed. pp.347-382. Plenum, New York.
23. Norkin LC. (1995) Virus receptors: implications for pathogenesis and the design of antiviral agents. *Clinic. Microbiol. Rev.* 8 (2):293-315.

24. Pacitti A and Gentsch J. (1987) Inhibition of reovirus type 3 binding to host cells by sialylated glycoprotein is mediated through the viral attachment protein. *J. Virol.* 61 (5): 1407-1415.
25. Ramírez-Herrera MA. (1993) Efecto del virus de síndrome de ojo azul sobre fibroblastos y morfología de la corteza cerebral cerebelo e hipocampo del cerdo infectado. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. (Biología celular). Universidad de Guadalajara.
26. Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas SH. (1997). Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig paramyxovirus of the blue eye disease. *J. Vet. Med. B* 44: 461-476.
27. Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, JM. Dueñas-Jiménez, Mora-Galindo J, Dueñas-Jiménez SH. (2001) Electrophysiological and morphological alterations in peripheral nerves by the pig paramyxovirus of the blue eye disease (PPBED) in neonatal pigs. *J. Vet. Med.* 48, 477-487.
28. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-Lopez J, Kennedy S. (1997) Lesions in the reproductive tract of boars experimental infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Pathol.* 117:237-252.
29. Reyes-Leyva J, Hernández-Jauregui P, Montañón LF, Zenteno E. (1993) The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl ( $\alpha$  2,3) lactose-containing structures. *Arch Virol* 133: 195-200.
30. Reyes Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz M, Ramírez H, Vallejo V, Zenteno E. (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el rubulavirus porcino. *Mensaje Bioquímico* 26: 99-127.
31. Reynolds, KA (2003). Conceptos de Virología. <http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/De%20La%20Llave.pdf>
32. Rima B, Alexander BJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, et al. (1995) Family Paramyxoviridae. In: *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabriel SA, Jarvis AW, Matelli GP, et al. editors. *Arch. Virol., Suppl.* 10, Springer-Verlag, New York, p. 272.
33. Rueckert RR (1996) Picornaviridae: The viruses and their replication. In: *Fundamental Virology* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 477-522

34. Sato C, Fukuoka H, Ohta K, Matsuda T, Koshino R, Kobayasi K, Troys F, Kitajima K. (2000) Frequent occurrence of pre-existing  $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked disialic and oligosialic acids with chain lengths up to 7 sia residues in mammalian brain glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 275(20):15422-15431.
35. Schweighardt B, Atwood WJ. (2001) Virus receptors in the human central nervous system. *J. NeuroVirol.* 7: 187-195
36. Stephano-Hornedo A. y Gay M. (1982) El síndrome del Ojo Azul. Estudio experimental. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en Mexico.* p.57.
37. Stephano-Hornedo A. (1983) Más sobre el síndrome del ojo azul. *Síntesis porcina.* 2. pp.15-18.
38. Stephano-Hornedo A, Gay-Gutiérrez M. (1985) Síndrome del ojo azul en cerdos (II). *Síntesis porcina.* 4 (6): 9-14.
39. Stephano-Hornedo A, Gay-Gutierrez M. (1986) El síndrome del ojo azul. Una nueva enfermedad en cerdos asociado a un paramixovirus. *Vet. Méx.* 17: 120-122.
40. Sundqvist A, Berg M, Hernandez-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. (1990) The structural proteins of the porcine paramyxovirus (LPMV) *J. Gen. Virol.* 71: 609-613.
41. Suryanti V. (2002) Sialic Acid Synthesising Enzymes. School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, UK. <http://www.bibcouncil.de/ISSM2002/Proceedings/paperPDF/c02.pdf#search='Sialic%20Acid%20Synthesising%20Enzymes'>
42. Ter Meulen V, Stephenson JR. (1983) The possible role of viral infections in MS and other related demyelinating diseases. In: *Multiple sclerosis.* Eds. Hallpike J.F, Adams C.W.M, Tourtellotte W.W . Ed: Champany and Hall, London. pp. 241-274.
43. Thoulouze M, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. (1998) The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J. Virol.* 72 (9): 7181-7190.
44. Traving C. and Schauer R. (1998) Structure, function and metabolism of sialic acid. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1330-1349
45. White JM. (1990) Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 675-697.

46. Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. (1991) Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J. Gen. Virol.* 72: 439-442.
47. Wiley DC, Skehel JJ (1987). The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of the influenza. *Annu. Rev. Biochem.* 56:365-394
48. Zmuda-Trzebiatowska, E. (1997). Glycosylation. University of London. School Of Crystallography.  
<http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps97/assignments/projects/emilia/Introduction.HTM>.