

RELEVANCIA DE OLIGOSACARIDOS DE LA SUPERFICIE CELULAR COMO MOLECULAS BLANCO EN LA INFECCION POR PARAMIXOVIRUS PORCINO LPM.

REYES-LEYVA J. HERNANDEZ-JAUREGUI P y ZENTENO E.

Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM; Depto. Inmunología CIBIOR, IMSS Puebla y Universidad Autónoma de Morelos, México.

INTRODUCCION.

El paso inicial en un proceso de infección viral es el reconocimiento de moléculas, en la superficie de las células, que actúan como receptores específicos y le permiten al virus adherirse, fusionarse y penetrar a su célula huésped.¹

El paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán (LPM) es responsable de una enfermedad neurológica, respiratoria y reproductiva acompañada por opacidad de la córnea, que afecta principalmente a lechones.² Estructuralmente, el virus porcino LPM posee dos glicoproteínas en su envoltura la proteína HN con actividad hemoaglutinante y neuraminidasa y la proteína F responsable de su actividad formadora de sincicios.³

En este trabajo se presenta el conjunto de estudios realizados para determinar la naturaleza química de los elementos que participan en el proceso de infección por el virus LPM.

OBJETIVOS.

Determinar la participación de oligosacáridos de la superficie celular como moléculas blanco en el proceso de infección por el paramixovirus porcino LPM.

MATERIAL Y METODOS.

Se realizaron ensayos de inhibición de la hemoaglutinación (HA) y de la formación de sincicios (FS) con azúcares, glicósidos y glicoproteínas complejas disponibles comercialmente. Los compuestos $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ sialil-lactosa y ácido N-glicolilneuramínico de alta pureza fueron donados por el Profr. Claude Michalsky de la Universidad de Ciencias y Tecnologías de Lille, Francia.

En los ensayos de inhibición de la HA se utilizaron eritrocitos de carnero y de humano grupo A2, en las pruebas de inhibición de la FS se utilizaron células Vero. En la mayoría de los ensayos se utilizaron sobrenadantes de células PK-15 infectadas con virus LPM, filtrados por membrana 0.22 μm . En ensayos con compuestos de alta pureza se utilizó virus LPM purificado.⁴ La proteína HN se obtuvo por sonicación del precipitado viral, separación en gradientes de sacarosa y purificación por cromatografía de exclusión molecular. El perfil de proteínas se corroboró por electroforesis en geles de poliacrilamida. Se realizaron ensayos de HA y de FS con células tratadas con enzimas neuraminidasa, proteinasa y tripsina. Además, se trataron células Vero con antibióticos inhibidores de la glicosilación para estudiar la expresión de oligosacáridos y glicoproteínas. La expresión

celular de azúcares se determinó con diversas lectinas conjugadas a fluoresceína o rodamina.

RESULTADOS

La digestión enzimática con neuraminidasa mostró que el virus LPM reconoce residuos de ácido siálico. Estos residuos no fueron necesariamente componentes de las proteínas extracelulares, ya que el tratamiento de las células con tripsina incremento el reconocimiento.

Los ensayos de competencia de unión utilizando azúcares, glicósidos y glicoproteínas complejas mostraron que el virus sólo reconoce anómeros α del ácido siálico. También, utilizando compuestos de alta pureza, mostramos que sialil(α 2,3)lactosa pero no sialil-(α 2,6)lactosa inhibió tanto la HA como la FS del virus LPM. Más aún, los compuestos que contienen residuos sialil(α 2,3)lactosa (IgA y orosomucoide) fueron los mejores inhibidores de la actividad HA del virus.

En otra serie de experimentos, el uso de tunicamicina y desoxinojirimicina, inhibidores de la glicosilación celular, redujo considerablemente la infección por el virus LPM. El uso de lectinas permitió determinar que el virus LPM sólo puede infectar células que expresan oligosacáridos complejos en su superficie. En este sentido, El virus porcino LPM sólo infectó aquellas células que expresan sialil(α 2,3)lactosa lo que fue confirmado utilizando la lectina de *Maackia amurensis* la cual reconoce específicamente moléculas de ácido siálico unidas en enlace α 2-3 a moléculas de galactosa.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que las moléculas de ácido siálico y de sialil(α 2,3)lactosa deben estar presentes en la superficie celular para que se realicen los procesos de adherencia e infección inducidos por el paramixovirus porcino LPM.

Por otra parte, utilizando a la glicoproteína HN purificada en ensayos de competencia de unión, se demostró que esta proteína es la responsable de la adherencia viral.

DISCUSION.

Nuestros resultados demuestran que similarmente a otros miembros del genero paramixovirus,⁵ el virus LPM reconoce específicamente estructuras que contienen ácido siálico. Al parecer la estructura mínima requerida para interactuar con el virus es el ácido siálico, ya que su eliminación de los eritrocitos disminuye la actividad aglutinante y su eliminación de las glicoproteínas IgA y orosomucoide evita su actividad inhibidora sobre el virus.

Sin embargo, la hemaglutinina parece poseer un sitio de unión restringido, ya que α -2,3 pero no α -2,6 sialil-lactosa resultó ser el mejor inhibidor de la actividad hemoaglutinante y formadora de sincicios del virus.

Diversos trabajos han demostrado la presencia de residuos sialil-

lactosa en tejidos respiratorio y nervioso de diversos mamíferos.^{6,7} Además, se ha demostrado la expresión elevada de estos compuestos en las etapas fetal y neonatal.⁸ La especificidad por azúcares del paramixovirus LPM podría explicar su atracción por los tejidos de cerdos jóvenes.

BIBLIOGRAFIA.

1. Tardieu M, Epstein RL, Weiner HL (1982) Interaction of viruses with cell surface receptors. *Int Rev Cytol* 80: 27- 61
2. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC (1988). Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet Rec* 122: 6-10
3. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jáuregui P, Linné T, Moreno-López J (1990) The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen Virol* 71: 609-613
4. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Eriksson A (1986) Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Arch Virol* 91: 221-231
5. Markwell MAK, Svennerholm L, Paulson JC (1981) Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5406-5410
6. Loveless RW, Feizi T (1989) Sialo-Oligosaccharides of Poly-N-Acetyllactosamine Series are Polarized at the Cilia and Apical-Microvilliar Domains of the Ciliated Cells in Human Bronchial Epithelium. *Infect Immun* 57: 1285-1289
7. Sonnino S, Ghidoni R, Chigomo V, Masserini M, Tettamanti G (1983) Recognition by two-dimensional thin-layer chromatography and densitometric quantification of alcali-labile gangliosides from the brain of different animals. *Analyt Biochem* 128: 104-114
8. Feizi T (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrates structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 14: 53-57

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo fué parcialmente financiado por el Consejo Asesor en Epidemiología y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.