

VARIANTES DEL RUBULAVIRUS PORCINO

Sánchez JI^{1*}, Doporto JM¹, Reyes J², Becerra A³, Alonso R⁴, Trujillo ME¹

1.- Departamento de Producción Animal Cerdos. FMVZ, UNAM, México D.F. 2.- Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente (CIBIOR).IMSS, Puebla. 3.- Proteína Animal S.A. De C.V., San Juan de los Lagos, Guadalajara. 4.- Laboratorio de Genética Molecular. FMVZ, UNAM

Introducción. El Rubulavirus porcino es causante de la enfermedad del Ojo Azul y pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, está constituido por seis proteínas estructurales: L, NP, P, M y dos glicoproteínas, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la glicoproteína de fusión (F). La hemaglutinina-neuraminidasa (HN) posee dos dominios funcionales, uno con capacidad para aglutinar eritrocitos y otro que se encarga de la eliminación de grupos de ácido siálico, siendo esta, la proteína a la cual se dirigen la mayor cantidad de anticuerpos (Santos-López *et al.* 2004).

Materiales y métodos. Se utilizaron siete cepas virales aisladas en diferentes años, provenientes de la zona bajo y occidente de la República Mexicana, las cuales fueron replicadas en la línea celular vero para obtener el ARN viral con el método descrito por GibcoBRL. Life Technologies December, 1996. Se amplificó el gen HN mediante la técnica de RT-PCR usando los siguientes iniciadores: Forward 5' AAT TAG GGA CTG ATC AAA TC 3' y reverse 5' TTA ATA GCG TGA TTG AAT CT 3', bajo las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C/4'; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/30'', alineación a 54°C/30'' y extensión a 72°C/1'; y 1 ciclo de extensión final a 72°C/3', utilizando 4 ng/μl de ADN templado. Una vez visualizado el gen de 1729 pares de bases fue secuenciado usando el KIT "BigDye terminator Cycle Sequencing" (PE, Applied Biosystems Foster, CA USA) y un secuenciador automático ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City USA). Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Contig Manager (DNAsis 2.6 for Windows) DNA and Protein Sequence Analysis System e ingresadas al Gen Bank con los siguientes números de acceso: PAC2 (Jalisco/1990) (EF413172), PAC3 (Jalisco/1992) (EF413173), PAC4 (Michoacán/1993)(EF413174), PAC6 (Jalisco/2001) (EF413175), PAC7 (Jalisco/2002) (EF413176), PAC8 (Jalisco/2002) (EF413177) y PAC9 (Jalisco/2003) (EF413178). Comparándolas con la secuencia reportada en 1992 por Sundqvist A. *et al.* (GeneBank accession: S77541)

Resultados. Las diferentes mutaciones nucleotídicas identificadas se encuentran expuestas y generan cambios en aminoácidos. Los virus PAC6 y PAC7 tienen 12 aminoácidos diferentes respecto al virus LPM. El virus PAC8 tiene 11 aa diferentes, el virus PAC3 presenta 8 aa diferentes, de los 576, sin embargo a nivel de bases fue el que presentó mayor número de mutaciones. El virus PAC4 presenta solo 1 aa diferente, ya que una de sus mutaciones fue silenciosa, siendo éste el más cercano al

virus LPM; el virus PAC2 presenta 9 aminoácidos diferentes con relación al virus de referencia, mientras que a nivel de bases presentó 21 mutaciones. Los virus PAC6, PAC7 y PAC9 presenta 11 y 12 aa diferentes con respecto al virus aislado en 1984. En el análisis del potencial electrostático se observa que el virus PAC3, modifica su carga (+) a carga negativa asociado al cambio del aminoácido (T223) con respecto a los virus LPM, PAC9 y CIV (A223). El aminoácido E456 de PAC9 tiene carga negativa, lo cual genera que en una región altamente positiva se genere una región con carga neutra. Los virus PAC9, CIV y LPM presentan el aminoácido A291 que genera carga positiva, sin embargo, la molécula de PAC3 presenta una mutación (D291), que va generar una carga negativa en la misma región, a su vez, la molécula del virus C-IV presenta un cambio de aminoácido (E347) que también modifica el potencial electrostático de la región de carga positiva a carga negativa. El a.a K514 que presenta PAC 9 genera que la molécula en esta región cambie de carga negativa a positiva.

Discusión. Las secuencias genómicas del ORF del gen HN que se obtuvieron a partir de aislamientos virales, obtenidos en diferentes brotes, nos permiten identificar los cambios genómicos que ha sufrido el virus a través del tiempo y que, durante el transcurso de los años observamos mediante un árbol filogenético, que aquellos virus obtenidos antes del año de 1993 se encuentran mas ligados al virus LPM, aislado en 1984; los virus PAC6, PAC7, PAC8 y PAC9 aislados en los últimos 5 años, son variantes derivadas del ancestro común, es decir, del virus LPM, pero cada vez mas distantes. En el análisis de nucleótidos se observa que el virus PAC9 aislado en el año 2003, es uno de los virus mas distante al virus LPM y los cambios observados pueden estar directamente relacionados a la signología reproductiva y respiratoria, algunas veces acompañado de opacidad de la cornea en hembras adultas, edad que no se había reportado con dicha signología. También hemos reportado la identificación de diferencias antigénicas mediante ensayos inmunológicos utilizando sueros hiperinmunes de cada cepa viral (Reyes Leyva J, *et al.*, 2002; Sánchez BJI, *et al.*, 2004).

Referencias bibliográficas. Santos-López G, Flores E, Baños R, Herrera-Camacho I, Reyes-Leyva J (2004). Arch Med Vet 36 (2).

Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz MT, Vallejo V, Zenteno E. (2002). Mensaje Bioquímico Volumen XXVI, 2002. Pp 99-127.

Sánchez Betancourt JI, Trujillo Ortega ME, Doporto Díaz JM, Reyes Leyva J. 2004. Tesis de Maestría.