

Importancia inmunológica de la proteína N en la infección por virus de la rabia

Immunologic importance of the N protein in the rabies virus infection

Ma. Esther Morales-Martínez*

Guadalupe Rico-Rosillo*
Álvaro Aguilar-Setién*

José Luis Gómez-Olivares**

Abstract

Rabies is an infectious disease that attacks animals and humans. It is transmitted through the bite of an infected animal with rabies virus. Although it has lethal consequences, its structure is not very complex, it only has five proteins G, N, P, L, and M2. Due to the necessity of tools to improve the effectiveness of the vaccine against rabies, this work focused on the study of N protein, that is the protein that is first produced and in large quantities when new viral particles replicate. This review presents evidence of the immunologic importance, structure, and maturation of this protein. N protein must be considered to improve the immune response in vaccines against rabies.

Key words: RABIES VIRUS, N PROTEIN, NUCLEOCAPSID, IMMUNE RESPONSE.

Resumen

La rabia es una enfermedad contagiosa que ataca a animales y humanos, se transmite por la mordedura de un animal infectado con el virus de la rabia y aunque causa daño letal, su estructura no es muy compleja, pues sólo presenta cinco proteínas: G, N, P, L y M2. Dada la necesidad de contar con una herramienta para mejorar la efectividad de una vacuna contra la rabia, este trabajo se avocó al estudio de la proteína N, que es la proteína que se produce inicialmente y en mayor cantidad cuando se replican nuevas partículas virales. Esta revisión proporciona evidencia de la importancia inmunológica, estructura y maduración de esta proteína. El trabajo propone que para mejorar la respuesta inmune en las vacunas contra la rabia, se debe considerar a la proteína N.

Palabras clave: VIRUS DE LA RABIA, PROTEÍNA N, NUCLEOCÁPSIDE, RESPUESTA IMMUNE.

Recibido el 13 de junio de 2005 y aceptado el 27 de enero de 2006.

*Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, AV. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720, México, D.F.

**Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco N° 186, Col. Vicentina 09340, Iztapalapa, México D.F.

Correspondencia: María Esther Morales-Martínez, Tel./Fax 5627-6943. Correo electrónico: estmormag@hotmail.com

Introduction

Rabies is an infectious disease that affects animals and man, it is considered a worldwide health problem (OMS).¹ The rabies virus (RV) is transmitted by the bite of dogs, cats, bats, foxes that carry the disease. The infection by bite uses saliva as a vehicle that deposits in striated muscle where it replicates itself until it reaches enough concentration to reach a sensorial or motor nerve, where it unites to acetylcholine receptors and enters the central nervous system (CNS), infects the neurons and causes a deviant behavior, called “furious rabies”, but when the infection penetrates to the neurocortex the clinical profile changes to “silent rabies”, that can present depression, coma and death by respiratory failure.²

The incubation period between the bite and the presence of CNS signs is between 14 and 90 days and depends on the distance of the bite to the CNS; but occasionally it may last years, this is possible since the virus stays secluded in the striated muscle.²

The rabies is one of the few diseases that can be prevented in humans by vaccination after the exposure to the virus, maybe due to its long incubation period. The fast appearance of neutralizing antibodies, directed against the glycoprotein G of the virus, seems to be related to the effectiveness of the protection.^{3,4}

The rabies is caused by the replication of a virus that presents a chain of ribonucleic acid in negative side, characteristic which includes it in the order of the Mononegavirals; it belongs to the family of the *Rhabdovirus* and the *Lyssavirus* genus that has, as a structural feature, the form of a bullet. There are six different known genotypes (GT): GT 1 includes the viruses of classic rabies and vaccinal strains; GT 2-6, viruses related to the rabies that include the Lagos bat virus (LB: GT2); Mokola virus (Mok: GT3); Duvenhage virus (Duv: GT4); the European bat *Lyssavirus* 1 (EBL-1: GT5); and of the European bat *Lyssavirus* 2 (EBL-2: GT6).³ The actual rabies vaccines give protection against GT2 and GT3.⁵

The classic rabies (GT1) has universal distribution and attacks the majority of mammals. The other *Lyssavirus* are more limited in their geographic distribution and the species they affect.

Structure

The dimension of the RV is near 100 to 300 nm of length and 75 nm of width, it presents five structural proteins: G, M2, L, M1 and N (N). The lipid and lipoprotein capsule constitutes the glycoprotein G (protein G) and, towards it, neutralizing antibodies are produced. The membrane protein or matrix (pro-

Introducción

La rabia es una enfermedad contagiosa que afecta a animales y al hombre, se considera un problema de salud en todo el mundo (OMS).¹ El virus de la rabia (VR) se transmite por la mordedura de perros, gatos, murciélagos, zorros que tienen la enfermedad. La infección por la mordedura usa como vehículo a la saliva que se deposita en el músculo estriado donde se replica hasta alcanzar una concentración suficiente para llegar a un nervio sensorial o motor, donde se une a receptores de acetilcolina y entra al sistema nervioso central (SNC), infecta a las neuronas y causa un comportamiento aberrante, que se le llama “rabia furiosa”, pero cuando la infección penetra a la neurocorteza el cuadro clínico cambia a “rabia silenciosa”, que puede presentar depresión, coma y muerte por paro respiratorio.²

El periodo de incubación entre la mordedura y la presencia de signos del SNC es entre 14 y 90 días y depende de la distancia de la mordedura al SNC, pero ocasionalmente puede durar años, esto es posible ya que el virus permanece secuestrado en el músculo estriado.²

La rabia es una de las pocas enfermedades que puede ser prevenida en humanos por vacunación después de la exposición al virus, quizá debido a su largo periodo de incubación. La rápida aparición de anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra la glicoproteína G del virus, parece relacionarse con la eficacia de la protección.^{3,4}

La rabia es ocasionada por la replicación de un virus que presenta una cadena de ácido ribonucleico en sentido negativo, característica que lo incluye en el orden de los Mononegavirales; pertenece a la familia de los *Rhabdovirus* y al género *Lyssavirus*, que tienen como rasgo estructural la forma de una bala. Se conocen seis diferentes genotipos (GT): GT1, incluye a los virus de las rabias clásicas y a las cepas vacunales; GT2-6, virus relacionados con la rabia que incluye el virus Lagos bat (LB: GT2); virus Mokola (Mok: GT3); virus Duvenhage (Duv: GT4); el *Lyssavirus* de murciélago europeo 1 (EBL-1: GT5); y *Lyssavirus* de murciélago europeo 2 (EBL-2: GT6).³ Las vacunas actuales de la rabia dan protección contra GT2 y GT3.⁵

La rabia clásica (GT1) tiene distribución universal y ataca a la mayoría de los mamíferos. Los otros *Lyssavirus* están más limitados en su distribución geográfica y en cuanto a las especies que afectan.

Estructura

La dimensión del VR es cerca de 100 a 300 nm de largo y 75 nm de ancho, presenta cinco proteínas estructurales: G, M2, L, M1 y N (N). La cubierta de lípidos y lipo-

tein M2) is important as intermediary and catalytic between and inside of the viral cover and the nucleocapsid (NC). A transcriptase (protein L) that is formed of 2 142 aminoacids, representing 54% of the genome, is important in the transcription. The phosphoprotein (protein NS or protein P) formed by 297 aminoacids has two forms with different extensions of phosphorylation, originally considered as component of the viral capsule. The P protein unites to the N for the synthesis of viral RNA, this union associates with the light chain of the cellular dynein, that is involved in the transport of the viral NC by means of the neuronal axons. Toriumi *et al.*,⁶ with the intention to know the function and conformational changes of the protein P, used a monoclonal antibody (# 402-13) and identified a linear epitope localized in the C-terminal region of the protein P, that has a specific conformation to be exposed only when the P protein is associated to the NC.⁶ The region of the epitope is essential so that the P protein associates with the NC, but not the formation of free complexes of N-P with new synthesized N protein.

The N protein (nucleoprotein) encapsulates the efficient viral RNA and specifically forms the ribonucleoprotein that supplies the mold for the transcription and replication of the RNA by the viral polymerase complex, which includes P protein and L.⁷ The N protein constituted by 450 aminoacids intervenes in the humoral and cellular immunity, it is the one with greatest diagnostic importance when its antigen is detected. The internal L, N and P proteins form a complex with the viral RNA to form the nucleocapsid (RNP or ribonucleoprotein)^{1,4,8,9} (Figure 1). The genome of the RV measures almost 12 Kb and codifies for five RNA monocistronic messengers that traduce for the five described proteins¹⁰ (Figure 2).

Immune response

To study the immune response (IR) in the infection by RV, different studies have been done: neutralizing antibodies titer, indexes of cellular proliferation, kinetic of multiplication of the virus, nitric oxide synthesis, expression of the gene inducible nitric oxide synthetase (iNOS), cytosines production [interferon γ (IFN- γ), interleukins 2,4 and 10 (IL2, IL4, IL10)], cytotoxic T lymphocyte, as well as the expression of the major histocompatibility complex (MHC) class I.

Viruses EBL-1 and EBL-2 have been isolated from European bats and are responsible of human deaths, this is one of the reasons why Herzog *et al.*³ evaluated the response of cells B and T in European bat *Lyssavirus* 1. They studied a group of healthy patients, without previous vaccination, that were exposed to the bite of a rabid animal, they were immunized with the

proteína constituye la glicoproteína G (proteína G) y hacia ella se producen los anticuerpos neutralizantes. La proteína de membrana o matriz (proteína M2) es importante como intermediario y catalítico entre y dentro de la envoltura viral y la nucleocápside (NC). Una transcriptasa (proteína L) que está formada de 2 142 aminoácidos, representa 54% del genoma, es importante en la transcripción. La fosfoproteína (proteína NS o proteína M1 o proteína P) formada por 297 aminoácidos tiene dos formas con diferentes extensiones de fosforilación, originalmente considerada como componente de la envoltura viral. La proteína P se une a la N para la síntesis del ARN viral, esta unión se asocia con la cadena ligera de la dineína celular, que está involucrada en el transporte de la NC viral a través de los axones neuronales. Toriumi *et al.*,⁶ con el propósito de conocer la función y los cambios conformacionales de la proteína P, usaron un anticuerpo monoclonal (# 402-13) e identificaron un epítipo lineal localizado en la región C-terminal de la proteína P, que tiene una conformación específica para estar expuesto sólo cuando la proteína P está asociada a la NC.⁶ La región del epítipo es esencial para que la proteína P se asocie con la NC, pero no para la formación de complejos libres de N-P con nueva proteína N sintetizada.

La proteína N (nucleoproteína) encapsida al ARN viral eficiente y específicamente para formar el complejo ribonucleoproteína que proporciona el molde para la transcripción y replicación del ARN por el complejo de polimerasa viral, el cual incluye la proteína P y la L.⁷ La proteína N constituida de 450 aminoácidos interviene en la inmunidad humoral y celular, es la de mayor importancia diagnóstica al detectar su antígeno. Las proteínas internas L, N y P forman un complejo con el ARN viral para formar la nucleocápside (PRN o ribonucleoproteína)^{1,4,8,9} (Figura 1). El genoma del VR mide casi 12Kb y codifica para cinco ARN mensajeros monicistronicos que traducen para las cinco proteínas descritas¹⁰ (Figura 2).

Respuesta inmune

Para estudiar la respuesta inmune (RI) en la infección por el VR se han realizado diferentes estudios: titulación de anticuerpos neutralizantes, índices de proliferación celular, cinética de multiplicación del virus, síntesis de óxido nítrico, expresión del gen óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), producción de citocinas [interferón γ (IFN- γ) interleucina 2, 4 y 10 (IL2, IL4, IL10)], linfocitos T citotóxicos, así como expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I.

Los virus EBL-1 y EBL-2 han sido aislados de murciélagos europeos y son responsables de muer-

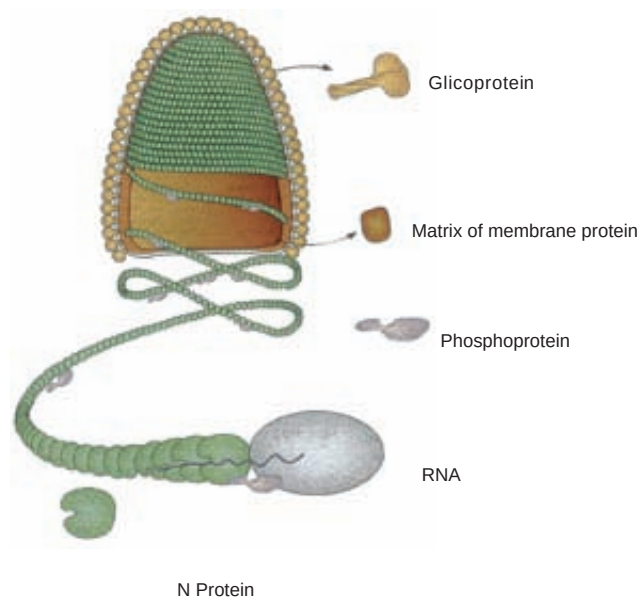


Figura 1: Estructura del virus de la rabia (P. Le Mercier).⁵¹

Figure 1: Structure of the rabies virus (P. Le Mercier).⁵¹



Figura 2: Genoma del virus de la rabia y la proteína N.⁵²

Figure 2: Genome of the rabies virus and the N protein.⁵²

strain PM (Pitman-Moore) post-exposition and the titers of neutralizing antibodies and rates of cellular proliferation *in vitro* were measured. In this study no correlation was found between the response of cells B and T in response to EBL-1.³

The immune response of the carrier can be important in the development of encephalitis.^{5,8,11} There is evidence that the RV may stay hijacked for long periods. In humans there are titers of antibodies only when neurological symptoms are present and in the last stages of the disease, when death occurs. In 1977, Iwasaki *et al.*¹¹ studied in mice the role of IR from the carrier in the development of the encephalic or paralytic disease after the infection with experimental rabies. They worked with three groups of mice (normal controls, immunosuppressed and athymic). After administering the strain ts2 CVS of RV, the kinetic of the virus' multiplication in the CNS, and the titers of antibodies were analyzed. In the control animals there was severe paralysis and caused 80% of deaths, accompanied by marked inflammation and destruction of the parenchymatose tissue of the CNS, RV was rarely isolated and there was production of antibodies against rabies; while in the immunosuppressed (cyclophosphamide) it caused 100% of deaths, there were encephalitis symptoms, in lesser degree paralysis and the histological changes were degeneration and necrosis of neurons, the virus was isolated in all the mice, but no antibody titers were

tes humanas, ésta es una de las razones por las que Herzog *et al.*³ evaluaron las respuestas de células B y T en *Lyssavirus* de murciélago europeo 1. Estudiaron a un grupo de pacientes sanos, sin vacunación previa, que estuvieron expuestos a la mordedura de un animal rabioso, se les inmunizó con la cepa PM (Pitman-Moore) posexposición y se les midió *in vitro* los títulos de anticuerpos neutralizantes e índices de proliferación celular; en este estudio no se encontró correlación entre la respuesta de células B y T en respuesta a EBL-1.³

La respuesta inmune del portador puede ser importante en el desarrollo de la encefalitis.^{5,8,11} Se tiene evidencia de que el VR puede permanecer secuestrado por largos periodos. En humanos hay títulos de anticuerpos sólo cuando están presentes los síntomas neurológicos y en las últimas etapas de la enfermedad, cuando ocurre la muerte. En 1977, Iwasaki *et al.*¹¹ estudiaron en ratones el papel de la RI del portador en el desarrollo de la enfermedad encefálica o parálisis después de la infección por rabia experimental. Trabajaron tres grupos de ratones (testigos normales, inmunosuprimidos y atímicos). Después de administrar la cepa ts2 CVS de VR, se analizó la cinética de multiplicación del virus en SNC y los títulos de anticuerpos. En los animales testigo hubo parálisis severa, y causó 80% de muertes, acompañada de inflamación marcada y destrucción del tejido parenquimatoso del SNC, raramente se aisló VR y hubo producción de anti-

detected. In the athymic mice (immune deficient) the symptoms were similar to the immunodepressed, but with production of IgM antibodies. It was concluded that the IR of the carrier is beneficial in the infection by the RV and is important in the destruction of the parenchymatose tissue and rise of the paralysis of extremities.

In the immunocompetent mice (control), the destruction of the parenchymatose tissue might be due to the humoral and cellular IR of the carrier by the generation of cytolytic antibodies and to the generation of cytotoxic cells in the RV infection. The absence of parenchymatose tissue destruction in immunodepressed (athymic) suggests dependence from the thymus, and the presence of IgM antibodies shows that these do not participate in the destruction of the parenchymatose tissue.¹¹

Sukathida *et al.*¹² evaluated the nitric oxide synthesis and the expression of the iNOS gene to study the pathophysiologic mechanism of brain damage and function of the neurons during the infection with RV, and concluded that the inhibition of iNOS retards the death of infected mice with RV by affecting the viral replication and the apoptosis of infected cells.

Innate immune response

The innate IR constitutes an early alert system to detect and fight infections of any kind. Contrary to adaptive immunity (antibodies, cellular specific immunity), the innate is of fast activation and does not generate immune memory. This defense system does not have the exquisite specificity of the adaptive immunity, but recognizes in a very efficient way generic kind of molecules produced by multiple and various pathogen agents, viruses included. When it detects any of these strange molecules, the immune system triggers a protection response; within it, the immune system makes an effort to stop the pathogen agent. The defense initiates by means of receptors e toll (TLR from toll-like receptors), a family of proteins that mediates the innate immune response, that are broadly distributed in the zoological scale, from crustaceans and insects to human beings.¹³ It has been determined that the TLR recognize basic molecules for the survival of bacteria, viruses, parasites and other pathogens. Recently, there are dozens of different TLR that recognize specific molecules (the TLR2 units to the lipoprotein acid, a component of the bacterial wall). In the case of viruses and the rabies there is no exception, the most important TLR are the TLR3 that recognizes the genetic material of the viruses and the TLR9 that recognizes repetitive sequences of the genome proper of viruses and the bacteria called CpG that are not methylated.¹⁴ In viruses the components of these

cuerpos contra la rabia; mientras que en los inmunosuprimidos (ciclofosfamida) causó 100% de muertes, hubo síntomas de encefalitis, en menor grado parálisis y los cambios histológicos fueron degeneración y necrosis de neuronas, se aisló el virus en todos los ratones, pero no se detectaron niveles de anticuerpos. En los ratones atímicos (inmunodeficientes) los síntomas fueron similares a los inmunosuprimidos, pero con producción de anticuerpos IgM. Se concluyó que la RI del huésped es benéfica en la infección por el VR y es importante en la destrucción del tejido parenquimatoso y ascenso de la parálisis de extremidades.

En los ratones inmunocompetentes (testigos), la destrucción del tejido parenquimatoso quizá se deba a la RI humoral y celular del portador por la generación de anticuerpos citolíticos y a la generación de células citotóxicas en la infección por el VR. La ausencia de destrucción de tejido parenquimatoso en inmunodeficientes (atímicos) sugiere dependencia del timo, y la presencia de anticuerpos IgM indica que éstos no participan en la destrucción del tejido parenquimatoso.¹¹

Sukathida *et al.*¹² evaluaron la síntesis de óxido nítrico y la expresión del gen de iNOS para estudiar el mecanismo patofisiológico de daño cerebral y funcional de las neuronas durante la infección por VR, concluyeron que la inhibición de iNOS retrasa la muerte de los ratones infectados con VR al afectar la replicación viral y la apoptosis de las células infectadas.

Respuesta inmune innata

La RI innata constituye un sistema de alerta precoz para detectar y combatir infecciones de cualquier tipo. Al contrario de la inmunidad adaptativa (anticuerpos, inmunidad celular específica), la innata es de activación rápida y no genera memoria inmunológica. Este sistema de defensa no tiene la exquisita especificidad de la inmunidad adaptativa, pero reconoce de manera muy eficiente clases genéricas de moléculas producidas por múltiples y variados agentes patógenos, incluidos los virus. Cuando detecta alguna de estas moléculas extrañas, el sistema inmune dispara una respuesta de protección; en ella el sistema inmune se esfuerza por detener al agente patógeno. La defensa se inicia mediante los receptores tipo *toll* (TLR de *Toll-like receptors*), una familia de proteínas que media la respuesta inmune innata, se encuentran ampliamente distribuidas en la escala zoológica, desde los crustáceos e insectos hasta el ser humano.¹³ Se ha determinado que los TLR reconocen moléculas básicas para la supervivencia de bacterias, virus, parásitos y otros patógenos. Actualmente se reconocen decenas de distintos TLR que reconocen moléculas específicas (el TLR2 se une al ácido lipoproteínico, un componente de la pared bacteriana). Para el caso de los

probably activate the innate immune system, but little is known about its identity or the route involved in its recognition.¹⁵ In the viral infection, the innate immune response is achieved through the induction of interferons type I (IFN- α and IFN- β), as well as by the activation of NK cells. The double chain of viral RNA that is produced during the replicated cycle may induce the expression of these IFN- α and IFN- β by the infected cell. In the innate immune response the NK cells produce cytokines, they have cytotoxic activity and are effective against viral infections. These cells are characterized phenotypically by the expression of CD56, absence of CD3 and production of IFN- γ , that has immune-regulatory and antiviral activity, which can be increased by the cytokine IL-12, which is produced early in the viral infection.^{16,17}

The macrophages represent an essential part in the innate immunity, when these cells detect a viral infection they synthesize multiple inflammatory mediators, like cytokines (IL-1, IL-6), chemokines, nitric oxide (NO), serum proteins, enzymes and interferons. These mediators intervene in antiviral mechanisms or intra-viral access routes. The monocytes and fibroblasts are also capable of synthesizing these cytokines, but the mechanisms that induce the production of interferons type I are not known. The IFN- α and IFN- β activate the signaling route JAK-SAT and with this, induces the expression of several genes. One of these codifies for the enzyme 2'-5' oligo adenylate synthetase (2-5(A)synthetase, that activates a ribonuclease (L RNase) and degrades the viral RNA. Other genes activated by union of these two interferon induces a specific protein kinase called dsRNA dependent of protein kinase (PKR), that inactivates the protein synthesis and blocks the viral replication in the infected cells.^{16,18}

Claassen *et al.*¹⁹ showed that administering RV antigens, they are captured by the macrophages and taken to the lymphoid nodules and spleen. In spite of these data, the innate immune response has not been studied in its totality. On the other hand, by immunohistochemistry and electronic microscopy, reclus macrophages were localized in the inoculation sites of RV, in these sites of infection, the macrophages induced pro-inflammatory responses that helped eliminate the viruses.²⁰

The viruses replicate better when the cells are activated; therefore, many viruses can deliberately activate the cells to increase the viral infection and replication (activation factors, growth factors and superantigens).

The complement also participates in the innate immune response. The molecules that regulate the complement are important to avoid its activation. Viruses have strategies to avoid immunity mediated

virus y el de la rabia no es la excepción, los TLR más importantes son el TLR3 que reconoce el material genético de los virus y el TLR9 que reconoce secuencias repetitivas del genoma propias de los virus y de las bacterias denominadas CpG que son no metiladas.¹⁴ En los virus los componentes de éstos presumiblemente activan al sistema inmune innato, pero poco se conoce acerca de su identidad o la ruta involucrada en su reconocimiento.¹⁵ En la infección viral, la respuesta inmune innata también se realiza a través de la inducción de interferones tipo I (IFN- α e INF- β), así como por la activación de células NK. La doble cadena de ARN viral que se produce durante el ciclo replicativo puede inducir la expresión de estos IFN- α e IFN- β por la célula infectada. En la respuesta inmune innata las células NK producen citocinas, tienen actividad citotóxica y son efectoras contra infecciones virales. Estas células se caracterizan fenotípicamente por la expresión de CD56, ausencia de CD3 y producción de IFN- γ , que tiene actividad inmunorreguladora, antiviral y su actividad se puede incrementar por la citocina IL-12, que se produce tempranamente en la respuesta a la infección viral.^{16,17}

Los macrófagos representan parte esencial de la inmunidad innata, cuando estas células detectan una infección viral sintetizan múltiples mediadores inflamatorios, como citocinas (IL-1, IL-6), quimioquinas, óxido nítrico (NO), proteínas del suero, enzimas e interferones. Estos mediadores intervienen en mecanismos antivirales o rutas de acceso intraviral. Los monocitos y fibroblastos también son capaces de sintetizar estas citocinas, pero aún no se conocen los mecanismos que inducen la producción de interferones tipo I. Los IFN- α e INF- β activan la ruta de señalización JAK-SAT y con ello induce la expresión de varios genes. Uno de éstos codifica para la enzima 2'-5'oligo-adenilatosintetasa (2-5(A)sintetasa), que activa una ribonucleasa (RNasa L) y degrada al ARN viral. Otros genes activados por la unión de estos dos interferones inducen una proteína cinasa específica llamada dsRNA dependiente de proteína cinasa (PKR), que inactiva la síntesis de proteínas y bloquea la replicación viral en las células infectadas.^{16,18}

Claassen *et al.*¹⁹ mostraron que administrando antígenos de VR son tomados por los macrófagos y llevados a los nódulos linfoides y al bazo. A pesar de estos datos, la respuesta inmune innata contra VR no está estudiada en su totalidad. Por otra parte, mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica se localizaron macrófagos reclutados en los sitios de inoculación de VR, en estos sitios de infección los macrófagos indujeron respuestas proinflamatorias que ayudaron a la eliminación de los virus.²⁰

Los virus se replican mejor cuando las células son activadas, por lo que muchos virus pueden activar deli-

by antibodies and complement and manipulate the inflammatory response produced by the carrier. These strategies include the incorporation of proteins that regulate the complement of the host inside the virion capsule and the expression of viral proteins that regulate the complement. The vaccinia virus can inhibit the classic and alternative routes to escape the neutralization by means of antibodies and protects the offsprings of the virion from the complement's attack of the host.²¹

Besides the mediators of the innate immune response against viruses, other molecules are involved, like the nitric oxide (NO) that suppresses the synthesis of RNA of the rabies virus, reducing the level of expression of G, L and N proteins, that is of our interest.²²

Protection

The glycoprotein and the nucleoprotein are the most important inductor antigens to know if there is protection against rabies. Unlike G protein, the N protein is the most preserved through the different genotypes, stimulates the production of TH cells,⁸ induces cross protection against intramuscular threats and stimulates the production of neutralizing antibodies induced by the classic vaccines.

The IR at two antigens in humans was studied: NC and glycoprotein in patients with rabies and immunized patients (virus grown in Vero cells). The results indicated that the process of immune recognition and antibodies development, occurs early in the pre-clinical phase, and the reactivity to N protein is important to the production of neutralizing antibodies.²³

The IL-2 increases the protection in experimental rabies when mice are exogenously inoculated, this cytokine exhibited a helper effect in RV vaccines and subunits of these vaccines.²⁴

The NC depends on a physical interaction between N and G proteins to have an adjuvant effect.⁸ This is the result of a presentation of products derived from both proteins by one same presenter cell of antigen. Thus, the specific TH cells for the N and G protein may act in synergism to stimulate the B lymphocytes and produce neutralizing antibodies.⁸

T lymphocytes were stimulated from immunized patients with PM vaccinal strain with IL-2; it was found that the T lymphocytes proliferate in response to rabies antigens only when the antigen's presenter cells express HLA-DR antigen. The stimulation of these T lymphocytes with rabies specific antigens induced the production of IFN- γ .²⁵

The N protein from the rabies influences over the cytolytic cells or T cells, offering protection against rabies in animals.²⁸ The cytotoxic T lymphocytes are

beradamente a las células para aumentar la infección viral y la replicación (factores de activación, factores de crecimiento y superantígenos).

El complemento también participa en la respuesta inmune innata. Las moléculas que regulan el complemento son importantes para evitar la activación de éste. Los virus tienen estrategias para evadir la inmunidad mediada por anticuerpos y complemento y manipulan la respuesta inflamatoria producida por el portador. Estas estrategias incluyen la incorporación de proteínas que regulan el complemento del huésped dentro de la envoltura del virión y la expresión de proteínas virales que regulan el complemento. El virus vaccinia puede inhibir las rutas clásica y alterna del complemento y así escapar de la neutralización a través de anticuerpos y protege a la progenie del virión del ataque del complemento del huésped.²¹

Además de los mediadores de la de la respuesta inmune innata contra los virus, se involucran otras moléculas como el óxido nítrico (NO) que suprime la síntesis de ARN del virus de la rabia, reduciendo el nivel de expresión de las proteínas G, L y N, que es de nuestro interés.²²

Protección

La glicoproteína y la nucleoproteína son los antígenos inductores más importantes para conocer si hay protección contra la rabia. A diferencia de la proteína G, la N es la más conservada a través de los diferentes genotipos, estimula la producción de células TH,⁸ induce protección cruzada contra retos intramusculares y estimula la producción de anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas clásicas.

Se estudió la RI a dos antígenos en humanos: NC y glicoproteína en pacientes con rabia y pacientes vacunados (virus crecido en células Vero). Los resultados indicaron que el proceso de reconocimiento inmune y desarrollo de anticuerpos ocurre tempranamente en la fase preclínica, y que la reactividad a la proteína N es importante para la producción de anticuerpos neutralizantes.²³

La IL-2 aumenta la protección en rabia experimental cuando se inyecta exógenamente a ratones, esta citocina exhibió un efecto adyuvante en las vacunas del VR y en las subunidades de estas vacunas.²⁴

La NC depende de una interacción física entre las proteínas N y G para que tenga un efecto adyuvante.⁸ Esto es resultado de una presentación de productos derivados de ambas proteínas por una misma célula presentadora de antígeno. Así, las células TH específicas para las proteínas N y G pueden actuar sinérgicamente para estimular a los linfocitos B y producir anticuerpos neutralizantes.⁸

Se estimularon linfocitos T de pacientes inmuniza-

important in the elimination of the infectious virus, since the RNP of the RV is an excellent inductor of the major histocompatibility complex (MHC-I). The RNP of the RV produces protective immunity, even though the mechanisms of protection are still unknown.²³ The antigens of the nucleoprotein activate the proliferation B cells; the N protein of the RV in the RNP complex induces a powerful response of T cells, this causes a humoral immune response against the RV. At the moment, certain researchers have incorporated strange genes within the genome of the RV to produce a recombinant virus that allows to examine, in this way, the immunogenicity to strange antigens. A recombinant RV was constructed which expresses the fusion protein of the HIV-1, N-GFP, that was efficiently produced and incorporated to the RNP, which induced an immune humoral response in mice (Koser *et al.*⁷), in contrast to the GFP protein alone. This data indicates that the RV nucleoprotein can be used as a carrier of strange antigens, and may be helpful for the use of RV as vector in dead vaccines against other infectious diseases.⁷

The glycoprotein of the rabies joined to liposomes *in vitro* induces the synthesis of specific cytokines. The production of IL-2 in splenic cells of immunized mice with antigens of rabies virus presented like immunosomes (liposomes covered with glycoprotein) were as active as the inactivated viruses, while the purified glycoprotein was inactivated.²⁷

Celis *et al.*²⁸ report that the immunization with RNP of purified RV did not induce neutralized antibodies, but protected the animals against a peripheral viral challenge, even if there are no neutralized antibodies at the moment of the challenge, the presence of TH facilitates rapid immune response of the antigens present in the viral challenge.

By means of synthetic peptides, the immunodominant epitopes of the NC *in vivo* by the stimulation of specific T lymphocytes were identified *in vitro*, this resulted in an increment of the response of T cells and rapid production of neutralized antibodies with inactivated RV.⁸

Perrin *et al.*²⁹ studied the production of cytokines of T cells in response to various *Lyssavirus* (rabies antigens) in BALB/c mice; IL-2, IL-4, IFN- γ , as well as their RNAm were evaluated. Only the infected mice with pathogenic viruses lost the capacity of producing cytokines *in vitro* after the antigen specific stimulation. In mice infected with non-pathogenic viruses there was cytokines production. Thus, the infection with pathogenic antigens of rabies by the peripheral route induces in BALB/c mice a loss of T-cell responsiveness after the specific antigen activation, but not after polyclonal activation (concanaline A). It was concluded that in mice, the loss of the immune response

dos con la cepa vacunal PM con IL-2, se encontró que los linfocitos T proliferan en respuesta a antígenos de rabia sólo cuando las células presentadoras de antígeno expresan antígeno HLA-DR. La estimulación de estos linfocitos T con antígenos de rabia específicos indujo la producción de IFN- γ .²⁵

La proteína N de la rabia influye sobre las células citolíticas o células T, ofreciendo protección contra la rabia en animales.²⁶ Los linfocitos T citotóxicos son importantes en la eliminación de virus, ya que la PRN del VR es un excelente inductor del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-I). La PRN del VR produce inmunidad protectora sin que se conozcan aún los mecanismos de protección.²³ Los antígenos de la nucleoproteína activan la proliferación de las células B; la proteína N del VR en el complejo PRN induce potente respuesta de células T, ello ocasiona una respuesta inmune humoral contra el VR. Actualmente algunos investigadores han incorporado genes extraños dentro del genoma del VR para producir un virus recombinante que permite examinar así la inmunogenicidad a antígenos extraños. Se construyó un VR recombinante que expresa la proteína de fusión del VIH-1, N-GFP, que se produjo e incorporó eficientemente a la PRN, lo que indujo en ratones una respuesta inmune humoral (Koser *et al.*⁷) a diferencia de la proteína GFP sola. Estos datos indican que la nucleoproteína del VR se puede usar como acarreador de antígenos extraños, y puede ser útil para el uso de VR como vector en vacunas muertas contra otras enfermedades infecciosas.⁷

La glicoproteína de la rabia unida a liposomas *in vitro* induce síntesis de citocinas específicas. La producción de IL-2 en células esplénicas de ratones inmunizados con antígenos del virus de la rabia presentados como inmunosomas (liposomas cubiertos de glicoproteína) fueron tan activos como los virus inactivados, mientras que la glicoproteína purificada fue inactiva.²⁷

Celis *et al.*²⁸ informan que la inmunización con RNP de VR purificada no indujo anticuerpos neutralizantes, pero protegió a los animales contra un reto viral periférico, aunque no existan anticuerpos neutralizantes al momento del reto, la presencia de TH facilita la respuesta inmune rápida de los antígenos presentes en el reto viral.

Mediante péptidos sintéticos se identificaron *in vitro* los epítomos inmunodominantes de la NC *in vivo* por la estimulación de linfocitos T específicos, ello resultó en incremento de la respuesta de células T y rápida producción de anticuerpos neutralizantes con VR inactivado.⁸

Perrin *et al.*²⁹ estudiaron la producción de citocinas de células T en respuesta a varios *Lyssavirus* (antígenos de rabia) en ratones BALB/c; se evaluaron

is related with the severity of the disease . The no response of T cells only depends on the severity of the disease in the mouse.

In an other work of Hooper *et al.*³⁰ mice were orally immunized with RNP, it was found an enhanced immune response, this demonstrates specificity in cellular response and production of antibodies against N protein .

The cellular immunity and interferons may reduce the viral load, the virus-specific antibodies and particularly the virus-neutralizing antibodies are very important in the control of the majority of the viral infections that affect the CNS.³¹ Perrin *et al.*²⁴ informed that IL-2 increased the protection in experimental rabies; nevertheless, in a previous study in which IL-2 and antibodies in human cells of peripheral blood of vaccinated individuals with PM strains or Pasteur was induced, there was no correlation between the production IL-2 and the levels of neutralized antibodies, it was concluded that the production of IL-2 could be used for the study of cellular immunity and memory cells in human anti-rabies vaccine.³²

Superantigens

The superantigens (Sag) can activate great number of T lymphocytes, since they are not internalized or processed by the antigen presenter cells. Less than 0.01% of T lymphocytes respond to a Sag, between 5% and 25% of the T lymphocytes may respond to an antigen of other type. In 1992 it was informed that the NC of the RV is a Sag specific for human V β 8 T lymphocytes, that unites to α chain HLA class II and it is a powerful activator of T lymphocytes in vaccines against rabies.³³

The capacity of the Sag of NC in RV to activate the cellular proliferation, cytokines and antibodies production was evaluated in lymphocytes of human tonsils. The activation produced by the Sag of the NC was compared to Sag derived from *Staphylococcus* (SEE and TSST-1); despite a weak T lymphocyte mitogenic activity restricted to CD4+ cells, NC triggered B lymphocytes to produce immunoglobuline G (IgG) (in quantities similar to those produced by Sag of SEE and TSST-1), and did not triggered the production of IgM. The cytokines produced by the activation of the NC were IL-4 and IL-10, this suggests that Sag of the NC induces a T_H2. The cytokines produced by TSST-1 activation were IL2 and IFN- γ , what suggests that TSST-1 induces a response TH1. The pattern T-2 pt2 induced by the Sag of the NC could explain the capacity to increase the antibodies response *in vivo* (to a simultaneously injected antigen). The NC of the rabies can trigger the activation of polyclonal B cells, like other Sag.³⁴

IL-2, IL-4, IFN- γ , así como sus RNAm. Sólo los ratones infectados con virus patógenos perdieron la capacidad de producir citocinas *in vitro* después de la estimulación antígeno específica. En ratones infectados con virus no patógeno hubo producción de citocinas. Así, la infección con antígenos de rabia patógeno por la ruta periférica induce en los ratones BALB/c pérdida de respuesta de células T después de la activación antigénica específica, pero no después de la activación policlonal (concanavalina A). Concluyeron que en el ratón, la pérdida de la respuesta inmune está relacionada con la severidad de la enfermedad. La no respuesta de células T depende sólo de la severidad de la enfermedad en el ratón.

En otro estudio de Hooper *et al.*³⁰ se inmunizaron ratones con PRN por vía oral, se encontró aumento en la respuesta inmune, ello demuestra especificidad en respuesta celular y producción de anticuerpos contra la proteína N.

La inmunidad celular y los interferones pueden reducir la carga viral, los anticuerpos virus específicos y particularmente los anticuerpos neutralizantes al virus son muy importantes en el control de la mayoría de las infecciones virales que afectan el SNC.³¹ Perrin *et al.*²⁴ informaron que la IL-2 aumentó la protección en rabia experimental; sin embargo, en un estudio previo en que se induce producción de IL-2 y anticuerpos en células humanas de sangre periférica de individuos vacunados con cepas PM o virus Pasteur, no se encontró correlación entre la producción de IL-2 y los niveles de anticuerpos neutralizantes, se concluyó que la producción de IL-2 podría ser usada para el estudio de la inmunidad celular y células de memoria en la vacunación antirrábica en humanos.³²

Superantígenos

Los superantígenos (Sag) pueden activar gran número de linfocitos T, ya que no son internalizados ni procesados por las células presentadoras de antígeno. Menos de 0.01% de linfocitos T responden a un Sag, entre 5% y 25% de linfocitos T pueden responder a un antígeno de otro tipo. En 1992 se informó que la NC del VR es un SAg específico para linfocitos T humanos V β 8, que se une a cadenas HLA clase II α y es potente activador de linfocitos T en las vacunas contra la rabia.³³

En linfocitos de amígdalas humanas se evaluó la capacidad del SAg de NC de VR para activar la proliferación celular, la producción de citocinas y anticuerpos. La activación producida por el SAg de la NC se comparó con SAg derivados de *Staphylococcus* (SEE y TSST-1); a pesar de una débil actividad mitogénica de linfocitos T restringida a células TCD4+, la NC disparó en los linfocitos B la producción de inmunoglobuni-

Astoul *et al.*³⁵ report that NC of the RV is a V β 8 specific exogenous SAg in humans and V β 6 mice. These authors studied the effect of rabies SAg, in response to unrelated antigen, the influenza virus, and compared the response in two congenic strains of mice: BALB/c and BALB/d2. The first are rabies SAg responsive, whereas the second ones are not responsive because they lack the V β 6 T cell receptor. In BALB/c mice, co-injection of rabies SAg with inactivated influenza virus resulted in a rapid and long term increase in the titers of influenza virus specific antibodies IgG and IgM against the virus, including protective hemagglutination-inhibiting antibodies, also the specific proliferation was incremented, as well as the IL-2 and IL-4 secretion by lymph node lymphocytes, when compared to mice that received influenza virus only. In contrast, in BALB/d2 mice, during the establishment of the primary response, the increase in influenza-primed T cells was mainly restricted to the V β 6 TCR. These data establish that rabies SAg can stimulate both T and B cell-specific responses to an unrelated antigen, this quality is the responsible of the adjuvant capacity of the NC.

Structural analysis of the N protein

The monoclonal antibody against the lineal 5-2-26 epitope dependent on phosphorylation is useful for the study of N protein phosphorylation, Kawai *et al.*³⁶ investigated the antigenic maturation of the N protein of the RV with monoclonal antibodies, and found that this protein does not immediately phosphorylate in the serine 389, initially it associates with the protein P of RV to form the nucleocapsid and then presents phosphorylation.

Goto *et al.*³⁷ studied the antigens' sites of the N protein of RV, but now, as classifying them from I to IV, it was observed that these sites are composed of epitopes that depend on linearity and conformation. By means of monoclonal antibodies and with the use of synthetic octapeptides they determined that the ones of site I and IV conform a small region that covers the aminoacids 357-387, which are the most conserved and common in the *Lyssavirus*. It was found that the epitopes in site I express themselves in the immature way of N protein and the epitopes of site IV express themselves in the mature N protein.

Phosphorylation

Proteins' phosphorylation in residues such as: serine, treonine and tyrosine are the most frequent ways of post-traductional modifications in eukaryotic cells, which are bind to the control of cellular functions. Many viral proteins are phosphorylated and their phos-

nas G (IgG) (en cantidades similares a las producidas por los SAg de SEE y TSST-1), y no disparó la producción de IgM. Las citocinas producidas por activación de la NC fueron IL-4 e IL-10, ello sugiere que el SAg de la NC induce una respuesta T_H2. Las citocinas producidas por activación de TSST-1 fueron IL2 e IFN- γ lo que sugiere que TSST-1 induce una respuesta TH1. El patrón T_H2 inducido por el SAg de la NC podría explicar la capacidad para incrementar la respuesta de anticuerpos *in vivo* (a un antígeno inyectado simultáneamente). La NC de la rabia puede disparar la activación de células B policlonales, como otros SAg.³⁴

Astoul *et al.*³⁵ informan que la NC del VR es un SAg exógeno específico V β 8 en humanos y V β 6 en ratones. Estos autores estudiaron el efecto del SAg de la rabia, en respuesta a un antígeno no relacionado, el virus de la influenza, y compararon la respuesta en dos cepas de ratones congénitas: BALB/c y BALB/d2. Los primeros responden al SAg de rabia, mientras que los segundos no responden por carecer del receptor de células T V β 6. En ratones BALB/c, la coinyección del SAg de rabia con el virus de influenza inactivado produce incremento rápido y de larga duración en los títulos de anticuerpos IgG e IgM específicos contra el virus, incluyendo anticuerpos protectores, inhibidores y hemoaglutinantes, también se incrementó la proliferación antígeno específica, así como la secreción de IL-2 e IL-4 por linfocitos de nódulo linfoide, cuando se compararon con los ratones que sólo recibieron el virus de la influenza. Sin embargo, en ratones BALB/d2 durante el establecimiento de la respuesta primaria, el aumento en las células T estimuladas estuvo restringida a células TCR V β 6. Estos datos establecen que el SAg de la rabia estimula respuestas T y B específicas a antígenos no relacionados, esta propiedad es la responsable de la capacidad adyuvante de la NC.

Análisis estructural de la proteína N

El anticuerpo monoclonal contra el epítipo lineal 5-2-26 dependiente de fosforilación es útil para estudiar procesos de fosforilación de la proteína N, Kawai *et al.*³⁶ investigaron la maduración antigénica de la proteína N del VR con anticuerpos monoclonales, encontraron que esta proteína no se fosforila inmediatamente en la serina 389, primero se asocia con la proteína P para formar la nucleocápside y luego se presenta la fosforilación.

Goto *et al.*³⁷ estudiaron los sitios antigénicos de la proteína N del VR, pero ahora al clasificarlos del I al IV, se observó que estos sitios están compuestos de epítipos que dependen de linealidad y conformación. Por medio de anticuerpos monoclonales y con el uso de octapéptidos sintéticos determinaron que los del sitio I y del sitio IV constituyen una pequeña

phorylation is important in the infectious viral cycle. The phosphorylation of some of the viral proteins is performed by kinases associated with the virus, and others by cellular kinases. The phosphorylation for one cellular kinase is a pre-requisite to obtain larger phosphorylation by kinases associated with virus.⁹

The protein N of rabies virus is phosphorylated not only in infected cells with viruses, but also when it expresses itself in insect and mammal cells; this suggests that cellular kinase, better than the associated kinase to the virus, may be involved in the phosphorylation of N protein of rabies virus. In a study, it was proven that the casein-kinase II (CK-II) of cellular origin is capable of phosphorylating the N protein of the rabies virus *in vivo* and *in vitro*. The phosphorylation of N protein is above a serine residue in the 389 position.¹¹

An important function of the N protein at structural level is to encapside and protect the genome. It is also involved in the change between viral transcription and replication as shown in studies the vesicular stomatitis virus (VSV), where it is observed that replication can not be initiated in the absence of sufficient N protein to encapside the growth mold. When the quantities of N protein remain low, the transcription recognizes a stop signal, and when the transcription is sufficient, participates in the growth and fit of the mold and does not respond to the stop signal, this event corresponds to the transition between the transcription and the replication. This specific encapsidation initiates in 5' terminal of the RNAs.³⁹

To demonstrate the domains of the N protein that govern binding specificity, Kouznetsoff *et al.*⁴⁰ tested *in vitro* the ability of N protein in both forms: full-length and truncated to interact with a synthetic RNA probe corresponding to the 5' end of the antigenome. They showed that the entire N protein and the NH₂ terminal of 376 aminoacids are all of the determinants for specific interaction. A peptide near the COOH terminal of τ 42 (position 298-352), which is located in the most conserved region of the Rabdoviridae N proteins, bound directly to the viral RNA. Both N proteins may possess a new type of RNA binding motif and folding proteins that contribute to the architecture of the RNA binding site.

When serine mutates to any of the following aminoacids: glycine, aspartic acid, asparagines, glutamic acid or glutamine in position 389, and examined the effects of these mutations over the transcription and replication in the genome, resulted in the synthesis of an unphosphorylated N protein and reduction of viral transcription and replication. Growth curves indicate that production of mutant virus with serine to alanine, was as much as ten thousand fold less than that of the wild type virus. The results indicate that phosphoryla-

ción que cubre los aminoácidos de 357-387, que son los más conservados y comunes en los *Lyssavirus*. Se encontró que los epítomos en el sitio I se expresan en la forma inmadura de la proteína N y los epítomos del sitio IV se expresan en la proteína N madura.

Fosforilación

La fosforilación de las proteínas en residuos como serina, treonina y tirosina son de las formas más frecuentes de modificación postraduccional en células eucarióticas, que están ligadas al control de funciones celulares. Muchas proteínas virales son fosforiladas y su fosforilación es importante en el ciclo viral infeccioso. La fosforilación de algunas de las proteínas virales se realiza por cinasas asociadas con el virus, y otras por cinasas celulares. La fosforilación por una cinasa celular es un prerrequisito para lograr mayor fosforilación por cinasas asociadas con virus.⁹

La proteína N del virus de la rabia se fosforila no sólo en células infectadas con virus sino también cuando se expresa sola en células de insecto y de mamíferos, ello sugiere que la cinasa celular más que la cinasa asociada al virus quizá está involucrada en la fosforilación de la proteína N del virus de la rabia. En un estudio se probó que la casein-cinasa II (CK-II) de origen celular es capaz de fosforilar a la proteína N del virus de la rabia *in vivo* e *in vitro*.³⁸ La fosforilación de la proteína N es sobre un residuo de serina en la posición 389.¹¹

Una función importante de la proteína N a nivel estructural es encapsidar y proteger al genoma. También está involucrada en el cambio entre la transcripción y replicación viral⁹ como se demuestra en estudios con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), donde se observa que la replicación no puede iniciarse en ausencia de suficiente proteína N para la encapsidación del molde de crecimiento. Cuando las cantidades de proteína N permanecen bajas, la transcripción reconoce una señal de paro, y cuando la transcripción es suficiente participa en el ensamble y crecimiento del molde y no responde a la señal de paro, este evento corresponde a la transición entre la transcripción y la replicación. Esta encapsidación específica inicia en el 5' terminal de los ARNs.³⁹

Para demostrar los dominios de la proteína N que gobiernan la especificidad de unión, Kouznetsoff *et al.*⁴⁰ probaron *in vitro* la habilidad de la proteína N en ambas formas: con longitud completa y truncada para interactuar con una sonda ARN sintética correspondiente a la 5' terminal del antisentido. Mostraron que en la proteína N completa y en la NH₂ terminal de 376 aminoácidos están todos los determinantes para la interacción específica. Un péptido cercano al COOH terminal de τ 42 (posición 298-352) localizado en la

tion of the RV is necessary for the transcription and replication.⁹

N Protein of the RV and the VSV do not have a high degree of homology in primary nucleotide and protein sequences; nevertheless, they have conserved regions and similar protein characteristics. The N protein of the VR has four conserved amino acid stretches homologous with those of VSV. Both proteins have similar helical structure.³⁸ The dephosphorylation of the N protein purified with phosphatase increases its ability to encapsid in the RNA synthesis *in vitro*. When N protein is not phosphorylated, the rate of transcription and replication are diminished in the genome as well as in the virus.

The mold for the transcription and replication of the negative short chain RNA is a N-RNA structure; that is to say, the RNA is associated to the viral nucleoprotein. The transcription signs will only be recognized when the viral RNA is joined to the N protein. When the N protein expresses alone in eukaryotic cells, it nonspecifically joins to RNA cells. In infected cells by rhabdovirus all the protein joins to the genomic RNA and not to RNAm or cellular, this is because the phosphoprotein joins as a chaperone to the nucleoprotein and prevents the union of N to cellular RNAm.

When the nucleoprotein N of RNA virus, expressed in insect cells, joins to a cellular RNA it forms a N-RNA complex like a viral nucleocapsid; nevertheless, in infected cells by virus, the N protein is prevented from joining to cellular RNA by the formation of a soluble complex between the N protein and the viral phosphoprotein, called N°-P complex. The N protein is only liberated from this complex by the union to a new RNA or a complementary RNA. In a study done by Mavrakis *et al.*,⁴¹ the co-expression of the viral N and P proteins of rabies in insect cells was observed and the soluble complex N°-P₂ was purified.

Recombinant N protein

Within the methods that permit the obtainment of RNP is the baculovirus system [pathogens that attack insects and other arthropods].* Utilizing molecular biology techniques, the gene that codifies for the N protein of RV can be obtained, which inserts in the genome of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis. The expression of the recombinant gene is controlled by the gene promoter of the polyhedrin. In order to obtain the recombinant protein, the baculovirus infects in insect cells [*Spodoptera frugiperda* (Sf9)].^{4,42,43} The N protein expressed in insect cells is antigenic and immunogenically comparable to RNP of RV and represents a potential source for an effective and economic vaccine to immunize humans and animals against rabies.^{42,43}

región más conservada de las proteínas N de los *Rhabdoviridae* se une directamente al ARN viral. Ambas proteínas N pueden poseer un nuevo tipo de motif conformacional de unión a ARN y proteínas de doblamiento que contribuyen a la arquitectura del sitio de unión al ARN.

Al mutar la serina por cualquiera de los siguientes aminoácidos: glicina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico o glutamina en la posición 389, y examinar los efectos de estas mutaciones sobre la transcripción y replicación en el genoma, produjeron una síntesis de proteína N no fosforilada, reducción de la transcripción y replicación viral. Las curvas de crecimiento indican que la producción del virus mutado en serina por alanina fue diez mil veces menor que la del virus silvestre. Los resultados indican que la fosforilación del VR es necesaria para la transcripción y replicación.⁹

La proteína N del VR y la del VSV no tienen alto grado de homología en su secuencia primaria de nucleótidos; sin embargo, ellas han conservado regiones y proteínas características similares. La proteína N del VR tiene cuatro aminoácidos conservados con homología a los de VSV. Ambas proteínas tienen estructura helicoidal similar.³⁸ La defosforilación de la proteína N purificada con fosfatasa aumentó su habilidad para encapsidar en la síntesis de ARN *in vitro*. Cuando la proteína N no está fosforilada, disminuyen las tasas de transcripción y replicación en el genoma igual que en el virus completo.

El molde para la transcripción y replicación de virus ARN de cadena negativa es una estructura N-ARN; es decir, el ARN está asociado con la nucleoproteína viral. Las señales de transcripción serán reconocidas sólo cuando el ARN viral está unido a la proteína N. Cuando la proteína N se expresa sola en células eucarióticas, se une inespecíficamente a ARN celulares. En células infectadas por rhabdovirus toda la proteína N se une al ARN genómico y no a ARNm o celulares, esto es porque la fosfoproteína se une como una chaperona a la nucleoproteína y previene así la unión de N a ARNm celular.

Cuando la nucleoproteína N de virus ARN expresada en células de insecto se une a ARN celular forma un complejo N-ARN como una nucleocápside viral; sin embargo, en células infectadas por virus, la proteína N es prevenida de uniones ARN celular por la formación de un complejo soluble entre la proteína N y la fosfoproteína viral, llamado complejo N°-P. La proteína N sólo es liberada de este complejo por unión a un nuevo ARN o un ARN complementario. En un estudio realizado por Mavrakis *et al.*⁴¹ se observó la coexpresión de las proteínas N y P virales de rabia en células de insecto y se purificó el complejo N°-P que se encontró en forma soluble como N°-P₂.

The RV as a viral vector in the use of vaccines has many advantages: it is not pathogenic for a great number of animal species if it administered orally or intradermically, its genome organization allows easy genetic modifications compared to other complex genomes of DNA and RNA virus. The uncommon genes that are expressed are stable. The rhabdovirus have a cytoplasmic replication cycle and there is no evidence for recombination and integration of the genome of the host cell. A vector based on RV can be inductor of immunity for mucous membranes against HIV-1.

The RV grows with high titers in many lines of cells without killing them, which allows the expression of HIV-1 genes compared with cytoplasmic vectors.⁴⁴ Schnell *et al.*⁴⁴ produced a recombinant RV which expresses the protein gp-160 of the HIV, in a stable and functional way in cellular lines of human T lymphocytes. The infection of the mouse with this virus that expresses this protein gave a strong humoral response, directed against the protein gp-160 of HIV-1 cover after a unique challenge against protein gp120. The titers of neutralized antibodies detected in mouse serum against HIV-1 were superior to 1:800, these results indicate that the live recombinant RV that expresses the protein HIV-1 gp-160 can be used as an effective vector for the HIV-1 vaccine.

The RV can be used as a vector of expression to construct a recombinant virus that expresses cytochrome C, which is an essential pro-apoptotic protein for the proteolytic activity of Apaf-1 and for the activation of caspases. Pulmanusahakul *et al.*⁴⁵ demonstrated *in vitro* that the expression of cytochrome C in the recombinant RV is associated with the accelerated cellular death, and *in vivo* increases the immunogenicity and attenuates the pathogenicity.

Thirty nine activated genes are known which intervene in the infection, including involved genes in the regulation of the cellular metabolism, protein synthesis, synaptic activity, growth and cellular differentiation. Prośniak *et al.*⁴⁸ demonstrated the effects of the RV infection in different patterns of gene expression in the brain of mice. An early response pattern (three days after infection) and a late response (6-7 days after infection) associated with peak RV replication. The results suggest that a number of host genes may be involved in the replication and spread of RV in the brain.

In a study by Loza-Rubio *et al.*⁴⁷ N protein recombinant was used to detect the mRNA of IL-2 in lymphocytes of immunized chicken, for these animals were inoculated with an inactive vaccine against avian influenza with N protein added. The results showed increment of expression of IL-2 in immunized animals when compared to control animals.

Proteína N recombinante

Dentro de los métodos que permiten la obtención de PRN se encuentra el sistema de baculovirus [patógenos que atacan a los insectos y otros artrópodos].* Empleando técnicas de biología molecular se puede obtener el gen que codifica para la proteína N del VR, el cual se inserta en el genoma del baculovirus *Autographa californica* nuclear de la polyhedrosis. La expresión del gen recombinante es controlada por el promotor del gen de la polyhedrina. Para obtener la proteína recombinante, el baculovirus se infecta en células de insecto [*Spodoptera frugiperda* (Sf9)].^{4,42,43} La proteína N expresada en células de insecto es antigénica e inmunogénicamente comparable a la PRN del VR y representa una fuente potencial para una vacuna contra la rabia efectiva y económica para la inmunización en humanos y animales.^{42,43}

El VR como vector viral en el uso de vacunas tiene varias ventajas: no es patógeno para un amplio número de especies animales si se administra vía oral o intradérmica, su organización genómica permite modificaciones genéticas fáciles a diferencia de otros genomas complejos de virus ADN y ARN. Los genes extraños que se expresan son estables. Los rhabdovirus tienen un ciclo de replicación citoplásmico y no hay evidencia para recombinación e integración en el genoma de la célula portadora. Un vector basado en VR puede ser inductor en inmunidad a mucosas contra VIH-1.

El VR crece con títulos altos en varias líneas de células sin matarlas, lo cual permite la expresión de genes VIH-1 comparados con vectores citoplásmicos.⁴⁴ Schnell *et al.*⁴⁴ produjeron un VR recombinante que expresa la proteína gp-160 del VIH, de forma estable y funcional en líneas celulares de linfocitos T humanos. La infección del ratón con este virus que expresa esta proteína dio una respuesta humoral fuerte, dirigida contra la proteína gp-160 de envoltura VIH-1 después de un reto único con proteína gp120. Los títulos de anticuerpos neutralizantes detectados en el suero del ratón contra VIH-1 fueron superiores a 1:800, estos resultados indican que el VR recombinante vivo que expresa la proteína VIH-1 gp-160 puede servir como un vector efectivo para una vacuna VIH-1.

El VR puede ser usado como vector de expresión para construir un virus recombinante que exprese citocromo C, que es una proteína proapoptótica esencial para la actividad proteolítica de Apaf-1 y para la activación de caspasas. Pulmanusahakul *et al.*⁴⁵ demostraron *in vitro* que la expresión del citocromo C en el VR recombinante se asocia con la muerte celular acelerada, e *in vivo* aumenta la inmunogenicidad y atenúa la patogenicidad.

*<http://www.erc-xford.ac.uk/cohoxford/groups/virusecdogg/bactaxon.htm>

The N protein in rabies' diagnosis

The N protein is primarily produced and in large quantities, that is why it is of importance for the detection of the rabies antigen. The CDC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia) for the diagnosis of rabies utilizes the gene of N protein for tests of PCR and formation of oligodendograms.^{48,49}

All the determinations and the genetic typification of the rabies virus isolated in America and other parts of the world are made based on a 320 pb segment localized in N protein, it is there where different isolates of distinct species, vectors and geographical sites are based.⁴⁹

The fluorescent antibody test developed by Coons and Kaplan in 1950,⁵⁰ is very useful for the rabies' diagnosis. The utilized material can be fresh or frozen. A marked antibody with fluorochrome (fluorescein isothiocyanate), is incubated with the tissue so that reacts with specific antigen (N protein), there will be fluorescent particles if the antigen is present.

Other test for the detection of rabies antigen is by enzymatic immunodiagnosis, called RREID. It is a highly sensible and specific method. The nucleocapsid antigen is extracted from the infected cells with RV and it is purified by a cesium chloride gradient. The viral antigens are emulsified with Freud adjuvant and they are inoculated IM in rabbits. The antinucleocapsid IgG antibodies of rabies are purified by chromatography and adsorbed in the solid phase, the incubation of a positive sample with the IgGs is revealed with a conjugate to rabbit peroxidase, appearing a yellow color after adding the substrate and chromogene (o-phenylenediamine); finally evaluated with a spectrometer.

The N protein that encapsides and protects the genome is involved in the transcription change and viral replication, it favors the cellular and humoral immune response, since it increases the production of neutralizing antibodies, for which it is said that has a coadjuvant effect, it has been considered as a superantigen when compared to conventional superantigens, it has a similar response, it also favors the TH₂ response (increases the IL-4 and IL-10). It is a exogenous specific superantigen of Vβ8 in humans and Vβ6 in mice.

The antigenic maturity depends on the N protein when it is phosphorylated in a serine residue on position 389 and by the presence of a cellular caseine.

It is the antigen of greater diagnosis importance on infected tissue.

The gene that codifies for the N protein is used in molecular epidemiology of rabies and other *Lyssavirus*.

It can be used as a strange protein carrier; there-

Se conocen 39 genes activados que intervienen en la infección, incluyen genes involucrados en la regulación del metabolismo celular, síntesis proteínica, actividad sináptica, crecimiento y diferenciación celular. Prosnia *et al.*⁴⁶ demostraron los efectos de la infección del VR en diferentes patrones de expresión de genes en el cerebro de ratones. Un patrón de fase temprana (tres días después de la infección) y un patrón de fase tardía (6-7 días de la infección) que se asocia con el pico de replicación de VR. Los resultados sugieren que genes del huésped pueden estar involucrados en la replicación y amplificación del VR en el cerebro.

En un estudio de Loza-Rubio *et al.*⁴⁷ se usó proteína N recombinante para detectar el mRNA de IL-2 en linfocitos de pollos inmunizados, para ello se vacunaron animales con una vacuna inactiva contra la influenza aviar adicionada con proteína N recombinante del VR. Los resultados mostraron incremento de la expresión de IL-2 en animales inmunizados cuando se compararon con animales testigo.

La proteína N en el diagnóstico de la rabia

La proteína N se produce primero y en grandes cantidades, por ello es importante para la detección del antígeno de la rabia. El CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia) para el diagnóstico de la rabia utiliza el gen de la proteína N para pruebas de PCR y formación de oligodendogramas.^{48,49}

Todas las determinaciones y la tipificación genética de los virus de la rabia aislados en América y otras partes del mundo se hacen con base en un segmento de 320 pb localizado en la proteína N, en él se basan los diferentes aislados de las distintas especies, vectores y sitios geográficos.⁴⁹

La prueba de anticuerpos fluorescentes desarrollada por Coons y Kaplan en 1950,⁵⁰ es muy útil en el diagnóstico de la rabia. El material utilizado puede ser fresco o congelado. Un anticuerpo marcado con el fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína), se incuba con el tejido para que reaccione con el antígeno específico (proteína N), si el antígeno está presente habrá partículas fluorescentes.

Otra prueba para la detección de antígeno de rabia es por inmunodiagnóstico enzimático, llamado RREID. Es un método altamente sensible y específico. Se extrae el antígeno de nucleocápside de células infectadas con VR y se purifica por un gradiente de cloruro de cesio. Los antígenos virales se emulsifican con adyuvante de Freund y se inoculan IM en conejos. Se purifican los anticuerpos IgG antinucleocápside de rabia por cromatografía y se adsorben en la fase sólida, la incubación de una muestra positiva con la

fore, is useful for an increased protective response in the use of vaccines.

Acknowledgments

Special thanks to the National Council of Science and Technology of Mexico, for its support in study 34214B, as well as scholarship 169991 granted to Maria Esther Morales in the doctorate program on biological sciences of the Metropolitan Autonomous University.

Referencias

1. Hostnik P, Bidovec A. Modern rabies extermination methods-ten years of rabies control by orally vaccinating foxes in Slovenia. *Res Rep -Univ Ljubl Vet Fac* 1999;36:223-230.
2. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, editors. *Veterinary Virology*. San Diego: Academic Press, 1999.
3. Herzog M, Fritzell C, Lafage M, Montaña HJA, Scott-Algara D, Lafon M. T and B cell human responses to European bat *lyssavirus* after post-exposure rabies vaccination. *Clin Exp Immunol* 1991;85:224-230.
4. Wiktor TJ, György E, Dieter Schlumberger H, Sokol F, Koprowski H. Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol* 1973;110:269-276.
5. Drings A, Jallet C, Chambert B, Tordo N, Perrin P. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine* 1999;17:1549-1557.
6. Toriumi H, Honda Y, Morimoto K, Tochikura TS, Kawai A. Structural relationship between nucleocapsid-binding activity of the rabies virus phosphoprotein (P) and exposure of epitope 402-13 located at the C terminus. *J Gen Virol* 2002;83:3035-3043.
7. Koser LM, McGettigan JP, Tan GS, Smith ME, Koprowsky H, Dietzschold B, *et al.* Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;102:9405-9410.
8. Ertl HCJ, Dietzschold B, Gore M, Otvos Jr L, Larson JK, Wunner WH, *et al.* Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J Virol* 1989;63:2885-2892.
9. Wu X, Gong X, Foley HD, Schnell M J, Fu Z. Both Viral Transcription are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. *J Virol* 2002;76:4153-4161.
10. Conzelmann KK, Cox JH, Schneider LG, Thiel HJ. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 1990;175:485-499.
11. Iwasaki Y, Gerhard W, Clark HF. Role of host immune response in the development of either encephalitic or paralytic disease after experimental rabies infection in mice. *Infect Immun* 1977;18:220-225.
12. Sukathida U, Chareeporn S, Yaowapa M. Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies

IgGs se revela con un conjugado a peroxidasa anticono, aparece un color amarillo después de adicionar el sustrato y el cromógeno (o-fenilendiamino); finalmente se evalúa cuantitativamente en un espectrómetro.

La proteína N que encapsida y protege al genoma está involucrada en el cambio de la transcripción y replicación viral, favorece la respuesta inmune celular y humoral, ya que aumenta la producción de anticuerpos neutralizantes por lo que se dice que tiene efecto adyuvante, se ha considerado como un superantígeno debido a que si se compara con superantígenos convencionales, su respuesta es similar, también favorece la respuesta T_H2 (aumenta la IL-4 e IL-10). Es un superantígeno exógeno específico de V β 8 en humanos y V β 6 en ratones.

De la proteína N depende la maduración antigénica cuando se fosforila en el residuo de serina de la posición 389 y por la presencia de una caseína celular.

Es el antígeno de mayor importancia diagnóstica en tejidos infectados.

El gen que codifica para la proteína N se usa en la epidemiología molecular de la rabia y otros *Lyssavirus*.

Puede ser utilizada como acarreador de proteínas extrañas; por tanto, es útil para el aumento de la respuesta protectora en el uso de vacunas.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, por el apoyo a la investigación 34214B, así como por la beca 169991 otorgada a María Esther Morales en el programa de doctorado en ciencias biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana.

- virus-infected mice. *J Med Microbiol* 2001;50:238-242.
13. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signaling. *Nature* 2004;430:257-263.
14. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, *et al.* A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745.
15. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Sousa CR. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-1531.
16. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000.
17. He X-S, Dragh M, Mahmood K, Holmes TH, Kemble GW, Dekker CL, *et al.* T cell-dependent production of IFN- γ by NK cells in response to influenza A virus. *J Clin Invest* 2004;114:1812.
18. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-738.
19. Claassen IJ, Osterhaus AD, Claassen E. Antigen detec-

- tion *in vivo* after immunization with different presentation forms of rabies virus antigen: involvement of marginal metallophilic macrophages in the uptake of immune-stimulating complexes. *Eur J Immunol* 1995; 25:1446-1452.
20. Charlton K, Casey GA. Experimental rabies in skunks: immunofluorescence light and electron microscopic studies. *Lab Invest* 1979;41:36-44.
 21. Ezekowitz RAB, Hoffmann JA. *Innate Immunity*. Totowa (New Jersey): Humana Press, 2003.
 22. Ubol S, Hiriotte W, Anuntagool N, Utaisincharoen P. A radical form of nitric oxide suppresses RNA synthesis of rabies virus. *Virus Res* 2001; 81:125-132.
 23. Kasempimolporn S, Hemachudha T, Khawplod P, Manatsathit S. Human immune response to rabies nucleocapsid and glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 1991;84:195-199.
 24. Perrin P, Joffret ML, Leclerc C, Joffret ML, Sureau P, Thibodeau L. Interleukin 2 increases protection against experimental rabies. *Immunobiology* 1988;177:199-209.
 25. Celis E, Miller WR, Wiktor TJ, Dietzschold B, Koprowski H. Isolation and characterization of human T cell lines and clones reactive to rabies virus: antigen specificity and production of interferon- γ . *J Immunol* 1986;136:692-697.
 26. Dietzschold B, Wang H, Rupprecht CE, Celis E, Tollis M, Ertl H, *et al.* Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoproteina. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9165-9169.
 27. Oth D, Mercier G, Perrin P, Joffret ML, Sureau P, Thibodeau L. The association of the rabies glycoprotein with liposome (immunosome) induces an *in vitro* specific release of interleukin 2. *Cell Immunol* 1987;108:220-226.
 28. Celis E, Ou D, Dietzschold B, Koprowski H. Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. *J Virol* 1988;3128-3134.
 29. Perrin P, Tino De Franco M, Jallet C, Fouque F, Morgueaux S, Tordo N, *et al.* The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses. *Res Virol* 1996;147:289-299.
 30. Hooper DC, Pierard I, Modelska A, Otvos L, Fang Fu Z, Koprowski H, *et al.* Rabies ribonucleocapsid as an oral immunogen and immunological enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10908-10912.
 31. Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weihe E, Koprowski H, Dietzschold B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol* 1998;72:3711-3719.
 32. Perrin P, Joffret ML, Zanetti C, Bourhy H, Gontier C, Fritzell C, *et al.* Rabies-specific production of interleukin-2 by peripheral blood lymphocytes from human rabies vaccines. *Vaccine* 1991;9:549-558.
 33. Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuilleier F, Charon D, *et al.* Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* 1992;358:507-508.
 34. Martinez-Arends A, Astoul E, Lafage M, Lafon M. Activation of human tonsil lymphocytes by rabies virus nucleocapsid superantigen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:177-184.
 35. Astoul E, Lafage M, Lafon M. Rabies superantigen as a V β T-dependent adjuvant. *J Exp Med* 1996;183:1623-1634.
 36. Kawai A, Toriumi H, Tochikura TS, Takahashi T, Honda Y, Morimoto K. Nucleocapsid formation and/or subsequent conformational change of rabies virus nucleoprotein (N) is a prerequisite step for acquiring the phosphatase-sensitive epitope of monoclonal antibody 5-2-26. *Virology* 1999;263:395-407.
 37. Goto H, Minamoto N, Ito H, Ito N, Sugiyama M, Kinjo T, *et al.* Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol* 2000;81:119-127.
 38. Wu X, Lei X, Fu Z. Rabies virus nucleoprotein is phosphorylated by cellular casein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:333-338.
 39. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory technique in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996.
 40. Kouznetsov A, Bucle M, Tordo N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. *J Gen Virol* 1998;79:1005-1013.
 41. Mavrikakis M, Iseni F, Mazza C, Schoehn G, Ebel C, Gentzel M, *et al.* Isolation and Characterization of the rabies virus N^o-P complex produced in insect cells. *Virology* 2003;305:406-414.
 42. Reid-Sanden F, Sumner JW, Smith JS, Fekadu M, Shaddock JH, Bellini W. Rabies diagnostic reagents prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus. *J Clin Microbiol* 1990;28:858-863.
 43. Fu ZF, Dietzschold B, Schumacher CL, Wunner WH, Ertl HCJ, Koprowski H. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2001-2005.
 44. Schnell M, Foley HD, Siler CA, McGettigan JP, Dietzschold B, Pomerantz RJ. Recombinant rabies virus as potential live-viral vaccines for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3544-3549.
 45. Pulmanausahakul R, Faber M, Morimoto K, Spitsin S, Weihe E, Hooper DC, *et al.* Overexpression of cytochrome c by a recombinant rabies virus attenuates pathogenicity and enhances antiviral immunity. *J Virol* 2001;75:10800-10807.
 46. Prośniak M, Hooper C, Dietzschold B, Koprowski H. Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2758-2763.
 47. Loza Rubio E, Esquivel Guadarrama F, Mercado Solis J, Gutiérrez Xicoténcatl L, Banda VM. Expresión del ARNm de la IL-2 en bazos de pollos vacunados contra el virus de la influenza aviar. *Téc Pecú Méx* 2003;41:141-152.
 48. De Mattos CA, De Mattos CC, Smith JS, Miller ET, Papo S, Utrera A, *et al.* Genetic characterization of

- rabies field isolates from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1996;34:1553-1558.
49. De Mattos CC, De Mattos, Loza-Rubio E, Aguilar-Setien A, Orciari LA, Smith JS. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:587-597.
50. Coons AH, Kaplan MM. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of a fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950;91:1-13.
51. Le Mercier P, Jacob Y, Tordo N. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 1997;78:1571-1576.
52. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith, Rougeon F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene?