

## El Herpesvirus Bovino-1: Estructura, replicación y latencia

Rodas JD, MV. MS, Zuluaga FN, MV. MS, Ossa JE, MV PhD.

### Resumen

*Los herpesvirus han sido considerados una de las familias virales más complejas no solo por su tamaño y estricto control de la replicación sino también por su singular capacidad de establecerse en forma latente y reactivarse con o sin signos clínicos.*

*En el presente artículo se revisan aspectos de la estructura molecular del HVB-1, su replicación y algunos de los mecanismos implicados en la latencia y reactivación de la infección viral.*

### Introducción

La composición y estructura molecular de los virus en general y de los Herpesvirus en particular, ha sido motivo de investigación exhaustiva en los últimos años. El tamaño, complejidad y comportamiento altamente evolucionado de los herpesvirus ha despertado un interés creciente en la funcionalidad de sus diferentes componentes; desde aquellos que participan en la adherencia y la replicación hasta los implicados en la fase de latencia y la reactivación.

La investigación de estas interrelaciones virus-hospedero trasciende hasta lo más profundo de la biología celular y molecular, las cuales se espera que en un futuro, suministren las respuestas a la gran cantidad de incógnitas planteadas en relación con los mecanismos de patogénesis y con aquellos que conducen a fenómenos tan singulares como el establecimiento y mantenimiento de la latencia y la reactivación.

El propósito de esta revisión es mostrar los más recientes descubrimientos en relación con estos tres aspectos básicos, estructura, replicación y latencia del HVB-1.

Muy seguramente el esclarecimiento de estos fenómenos permitirá definir los blancos de posible intervención para lograr inhibir o por lo menos reducir la diseminación de la infección natural.

### 1. Estructura molecular

El HVB-1 tiene aproximadamente 150 nm de diámetro, está envuelto en una bicapa lipídica de procedencia nuclear, y como todos los herpes se replica en el núcleo de la célula hospedera (12). La envoltura lipídica lo hace más sensible a la inactivación por factores ambientales y por solventes orgánicos tales como éter, cloroformo, alcohol y acetona. El virión mantiene su infectividad a -50°C hasta por 9 meses, a 22°C por 50 días y a 37°C durante 10 días; en cambio se inactiva por exposición a 56°C durante 20 minutos (23).

El virión contiene un genoma DNA de doble banda de 135-140 kilopares de bases el cual se encuentra dividido en dos segmentos, uno largo (UL) de 102-104 kpb y uno corto (US) de 10.5-11kpb, separados por una sección interna repetida (IR) y flanqueados por regiones repetidas invertidas de aproximadamente 24kpb (39). Dicho genoma tiene una capacidad codificante de aproximadamente 70 proteínas sin embargo, durante la infección productiva, sólo han sido identificados a la fecha 54 transcritos mediante la técnica de Northern blot; esto coincide aproximadamente con las 33 proteínas estructurales y las 15 no estructurales que, hasta el presente, se han reportado para este virus. De las proteínas estructurales, 13 están asociadas con la envoltura viral, 14 con la nucleocápside y 6 aún no han sido clasificadas (1).

La cápside viral está rodeada por una monocapa de materia globular denominada "tegumento" compuesta

\* Programa de Reproducción, Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

por 4 proteínas denominadas VP8, VP7, 91 y 107. Aunque estas proteínas han sido pobremente caracterizadas, la VP8 con un peso aproximado de 96 Kd es considerada la proteína mayor del tegumento y a pesar de ser una proteína tardía se encuentra tan temprano como las 2h posinfección, lo que ha hecho pensar que viaja con el inóculo y cumple una función reguladora en la expresión de genes tempranos ( $\alpha$  o E). Adicionalmente esta proteína es difícilmente reconocida por anticuerpos contra el HVB-1, pero facilita una buena respuesta inmune celular (42).

Aunque se desconocen los receptores celulares de los alfa herpesvirus se sabe que, en la mayoría de las células permisivas, la adherencia inicial es mediada por la interacción de la glicoproteína gIII con los glicosaminoglicanos celulares tales como el heparán sulfato; no obstante, virus mutantes en gIII conservan la capacidad de adherirse, penetrar y replicarse. Por lo anterior se sospecha que la gI y la gIV, proteínas que cumplen un papel esencial en la entrada del virus a la célula, podrían suplir la función de la gIII (2, 34, 38).

### Glicoproteínas

Existen 10 glicoproteínas con pesos moleculares que van desde 42 hasta 180 kda. Estudios de inmunoprecipitación y mapeo de péptidos indican que estas se originan a partir de 6 de ellas denominadas I, II, III, IV, 93 y 42. Adicionalmente han sido localizadas secuencias codificantes de 3 glicoproteínas correspondientes a las E, G e I del Virus Herpes Simplex-1 (VHS-1), sin embargo hasta la fecha nada se sabe acerca de la estructura y función de estas últimas (39).

De acuerdo con la caracterización genética y funcional de estas glicoproteínas parece existir una gran homología en función y estructura con aquellas del VHS-1, y debido a esto, se ha propuesto un cambio en la nomenclatura de las glicoproteínas del HVB-1 para equipararlas con las del VHS-1 así: gp I = gp B, gp II = gp H, gp III = gp C, gp IV = gp D y las E, G e I conservando el mismo nombre en ambos agentes (15)

**gp I:** Esta glicoproteína al igual que las gp III y IV, son las mayores glicoproteínas encontradas en la

envoltura del virión y en membrana plasmática de células infectadas (10).

La gp I induce una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes y es reconocida por linfocitos T ayudadores (CD4). También se ha sugerido que la gp I está involucrada en las interacciones iniciales entre el virus y la célula tales como la adherencia, la penetración y la fusión celular (2).

Informes recientes sugieren que el clivaje de la gp I puede ser necesario para la diseminación del virus de célula a célula (16).

**gp II:** Esta glicoproteína es altamente conservada entre diferentes herpesvirus, sugiriendo que es importante para la replicación de estos. En cuanto a sus propiedades parece estar involucrada en la entrada del virus a la célula y la diseminación del virus de una célula a otra (41).

**gp III:** Esta glicoproteína induce anticuerpos neutralizantes y es reconocida por linfocitos CD4 y CD8; así mismo han sido identificados en esta proteína epítopes para linfocitos T y B (19). Es considerada la proteína más involucrada en adherencia a través de receptores semejantes a la heparina sobre células en cultivo. Aunque han sido encontrados en experimentos preliminares hasta 5 epítopes de unión a la heparina, mutantes del HVB-1 carentes de la gp III se replican "in vitro", indicando que ella no es esencial para la replicación en cultivos celulares (39)

**gp IV:** Esta glicoproteína parece esencial para la replicación viral y esta involucrada tanto en adherencia como en penetración y fusión celular. Induce una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes y es reconocida por células T CD4 y CD8+ haciéndola una fuerte candidata para la vacuna subunitaria. También parece poseer dos epítopes para células T y B (5,21,40).

**Otras gp:** Recientemente han sido descubiertas otras dos gp de 42 y 93 kda en células infectadas pero hasta ahora se desconoce cuales genes las codifican así como su función en la replicación viral y respuesta inmune (43).

También se ha reportado la existencia de secuencias codificantes para otras tres proteínas homólogas a las E, G e I presentes en el VHS-1 pero no se sabe nada acerca de la estructura y función de ellas (27).

#### **Enzimas codificadas por el virus**

**Timidina kinasa (Tk):** Esta enzima, importante para la virulencia de los herpesvirus ha sido desde su descubrimiento, uno de los principales, si no el más importante, blanco en la terapia antiviral contra estos agentes. Los primeros estudios utilizando células infectadas con el HVB-1 mostraron la inducción de una nueva Tk, la cual difirió de la actividad enzimática de la célula del huésped en la especificidad del sustrato, termoestabilidad y en su habilidad para usar diferentes nucleótidos trifosfatados como donadores de fosfatos (44).

Adicionalmente para confirmar la naturaleza específica del virus de esta actividad enzimática, el aislamiento de un HVB-1 mutante que carecía de esta actividad enzimática, sugirió que la actividad Tk no es esencial para la replicación viral. Sin embargo, la delección del gene de la Tk reduce la virulencia del virus in vivo. El análisis por northern blot identificó el transcripto que codificaba para esta enzima como un RNA de 4.3 Kb (25,44).

**Deoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa):** Esta enzima también está altamente conservada entre los herpesvirus y es un componente importante para la vía de síntesis de novo de la deoxi Timidina Monofosfato (dTMP). Esta enzima cataliza la degradación de la deoxi Uridina Trifosfato (dUTP) a deoxi Timidina Monofosfato (dTMP) y Pirofosfato inorgánico (PPi) y mantiene los niveles intracelulares de dUTP. El aislamiento de un mutante por delección de dUTPasa confirmó la asignación de este gen y sugirió que esta enzima no es requerida para la replicación de este virus in vitro (20).

**Ribonucleótido Reductasa (RR):** Es considerada una de las enzimas claves en proceso de replicación de los virus con genoma DNA. Consta de dos subunidades, una grande y una pequeña, es ubiqüa en la naturaleza y

cataliza la conversión de ribonucleótidos a sus correspondientes deoxirribonucleótidos. Estudios basados en homología de secuencia, han detectado secciones del genoma del HVB-1 que probablemente codifican una RR pero no existe aún una verificación bioquímica (35).

**DNA polimerasa:** En la década de los 80, algunos estudios con el HVB-1 mostraron la inhibición de su replicación con ácido fosfonoacético, cuyo blanco de acción en los herpesvirus eran las polimerasas virales. Lo anterior sugirió que el HVB-1 codificaba por una DNA polimerasa. Posteriormente el gen fué localizado en la región UL del genoma y un análisis de secuencia parcial de dicho gen mostró una fuerte homología con el extremo carboxi terminal de polimerasas virales codificadas por otros herpesvirus (39).

**Otras proteínas codificadas por el HVB-1:** El análisis de las proteínas sintetizadas en células infectadas con el HVB-1, tratadas con cicloheximida y actinomicina D, permitió identificar tres proteínas clasificadas como Inmediatas Tempranas (IE) (8); las cuales son:

**BICP4:** Es homóloga de la ICP4 del VHS-1, es la proteína IE más grande (180 Kda). Los ensayos de expresión transitoria han sugerido que esta proteína puede actuar como transactivador y como represor de la transcripción (32).

**BICP0:** Homóloga a la ICP0 del VHS-1. Es una proteína de 135 Kda cuya supuesta función es actuar como dedo de zinc. Posee un marco de lectura abierto de 2028 pb que codifica una proteína de 676 aa. y presenta al parecer funciones muy semejantes a la anterior (8).

**BICP22:** Se desconoce la función de esta proteína que tiene una homóloga en el VHS-1 (ICP22). Su peso molecular es de 55 Kda (46).

Además de estas tres proteínas IE se ha identificado un transcripto IE derivado del extremo terminal repetido del segmento US y el extremo izquierdo de

UL. Posee un ORF de 741 pb con potencial para codificar una proteína de 247 aa. que parece ser homóloga de ORF 2 y 3 de los virus de la Varicella-Zoster y el Herpesvirus Equino respectivamente. Debido a que esta proteína aparentemente se origina desde el genoma circular ha sido llamada proteína codificada "*circ*" (39).

**VP8:** es una proteína homóloga de la 13M4 del VHS-1. Es la proteína viral más abundante encontrada en el tegumento de los viriones y células infectadas. Los estudios preliminares la describen como una fosfoproteína que parece modular la transactivación de genes IE mediante el producto génico del gen  $\beta$ -tif (42).

**$\beta$ -tif:** homóloga a la VP16 del VHS-1 de cuyas características bioquímicas y funciones biológicas se sabe muy poco, parece estar involucrada en la activación de la transcripción de genes IE (13).

**MDBP:** es la llamada proteína mayor de unión al ADN y parece jugar un papel regulador en función y de estabilización del complejo replicativo DNA durante la replicación del HVB-1 (39).

Finalmente se ha detectado una proteína homóloga a la UL 24 del VHS-1 que se orienta en sentido inverso al ORF de la Tk y parece ser indispensable para la replicación viral por lo menos in vitro (13).

### 1. Análisis genómico

Aunque los virus aislados a partir de bovinos con RIB o VPI son idénticos por análisis serológicos convencionales, algunos investigadores han encontrado que los agentes aislados en estos dos síndromes pueden ser diferenciados por comparación del patrón de fragmentos del DNA obtenidos después de la digestión con endonucleasas de restricción. Usando esta técnica, los aislamientos del HVB-1 han sido originalmente clasificados como "*semejantes a RIB*" o "*semejantes a VPI*" (3, 36).

Posteriormente se ha aplicado un sistema de numeración a la clasificación basado en el análisis genómico y en el patrón de polipéptidos virales, dando primero el tipo de virus, seguido por un punto decimal

y un número para identificar el subtipo y aunque esta clasificación es útil para propósitos taxonómicos no muestra una estricta correlación entre el origen clínico del aislamiento y su subtipo molecular. Sin embargo, parece posible una parcial correlación entre el subtipo 1 con las cepas que producen RIB (cuyo modelo es la cepa Cooper) y el subtipo 2 con las que producen Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (VPI) o Balanopostitis Pustular Infecciosa (BPI), cuyo modelo es la cepa k22 y el subtipo 3 que agrupa las cepas neurotrópicas y actualmente se encuentra en proceso de reclasificación (24).

En Europa, los aislamientos del HVB-1 asociados con enfermedades del tracto respiratorio o con aborto fueron del subtipo 1 ó 2a, mientras que los aislamientos del subtipo 2b estuvieron asociados sólo con enfermedad genital (36).

En contraste con lo anterior, estudios recientes en Norteamérica fallaron en encontrar alguna correlación entre el subtipo de clasificación del HVB-1 aislado y el tejido a partir del cual era obtenido. Aparentemente las variaciones son relativamente pequeñas y detectables sólo después de la digestión con enzimas que produzcan un gran número de fragmentos del DNA en ciertas regiones del genoma viral (por ejemplo Pst I y Bg II). Enzimas que discriminan menos, tales como Hind III y Hpa I, no son útiles para clasificar los aislamientos del HVB-1 dentro de los grupos RIB 1.1 ó RIB 1.2 (24).

### 2. Replicación viral

La iniciación de la infección con el HVB-1 en células permisivas tiene lugar por la adherencia de glicoproteínas virales a los receptores de la superficie celular (tales como las moléculas de heparina) (2). La fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática del hospedero libera la nucleocápside y el tegumento dentro del citoplasma de la célula, donde ellas son transportadas al núcleo. En el núcleo la transcripción de los genes virales se inicia en una forma regulada por el tiempo. Las proteínas del tegumento, las cuales pueden incluir  $\beta$ -tif y VP8, regulan las proteínas celulares e inician la transcripción y traducción de genes virales seleccionados que codifican proteínas IE tales como BICP0, BICP4 Y BICP22. La función de estas

proteínas IE es inducir la transcripción y la traducción de la proteínas tempranas tales como la Tk y la DNA polimerasa. Estas proteínas tempranas están predominantemente involucradas en replicación del genoma y la inducción de la síntesis de las proteínas tardías que forman las proteínas estructurales del virión, tales como la gp III y la VP8 (39).

Tanto la replicación del genoma como el ensamble de las nucleocápsides (DNA viral y algunas proteínas tempranas y tardías) ocurre en el núcleo de las células infectadas (11,26).

Estas nucleocápsides toman la envoltura lipídica por la gemación a través de la membrana nuclear y las partículas virales maduras son liberadas por ruptura de las células infectadas o fusión de las mismas con células no infectadas (16,10).

### 3. Latencia y reactivación

El agente causal del RIB, el Herpes virus bovino-1, tiene la capacidad de establecerse en forma latente al igual que todos los otros virus pertenecientes a esta familia. Los alfa herpesvirus, particularmente, se albergan por largos períodos en los ganglios ciático y trigémino luego de la infección genital y respiratoria respectivamente, y se pueden reexcretar a intervalos con o sin signos clínicos de la enfermedad (11,12,28).

Se ha sugerido que la inmunidad mediada por células puede jugar un papel determinante en la disminución de la duración y de la gravedad de la infección recurrente (26).

Aunque se desconoce el mecanismo para la reactivación viral se ha establecido que ciertos estímulos tales como cambios climáticos (principalmente las altas temperaturas), exposición a los rayos ultravioleta, influjo de hormonas reproductivas (durante el período de gestación), traumas en el sitio de la primoinfección, corte o sección de las raíces dorsales que inervan los ganglios sensoriales o simpáticos (11,37) hacinamiento y en general cualquier forma de estrés que pudiera alterar los mecanismos de defensa del hospedero, puede desencadenar la reactivación de la infección (28). Adicionalmente se ha demostrado que el tratamiento con corticosteroides produce reactivación viral en animales infectados en

forma latente (33), aunque la inmunosupresión causada por estos parece no ser el único mecanismo implicado en la reactivación (7,29).

Hasta hace poco el gen de la timidina quinasa (tk), uno de los más estudiados en los herpes, se consideró como el responsable directo de la latencia. Aparentemente un virus Herpes Simplex-1 (HSV-1) con una deleción en dicho gen, no pudo recuperarse durante un intento de reactivación inducida con dexametasona luego de ser inoculado en un modelo murino (44).

Algunos investigadores que consideraron al ratón como un modelo inadecuado para estudios de latencia con el Herpes Simplex-1, realizaron un nuevo ensayo, esta vez con el HVB-1 carente del gen en cuestión, en su hospedero natural; en esta ocasión en contraposición a los hallazgos previos, fué posible la reactivación del agente (30).

Lo anterior plantea una controversia aún sin solución, puesto que aunque parece claro que los virus tk- (aquellos que carecen de la enzima) requieren de la enzima celular para reactivarse, es poco claro cómo dichos virus logran replicarse en las neuronas, en las cuales las enzimas se encuentran en escasa cantidad ya que dichas células permanecen en estado de mitosis suspendida y por lo tanto no disponen o disponen sólo en muy poca cantidad de la tk (25).

Otros estudios que han tratado de aclarar el fenómeno de la latencia, han descubierto la presencia consistente de unos transcritos asociados a la latencia denominados Lat's, en los ganglios neuronales de pacientes humanos seropositivos infectados latentemente con herpes simplex-1. La detección de dichos transcritos ha sido posible mediante la técnica de hibridización in situ en tejido nervioso (30).

Curiosamente, los Lat's se reducen en número durante los períodos de reactivación viral, por lo que se ha sugerido que tales fragmentos podrían bloquear genes codificadores de la transcripción inmediata temprana, implicados en el ciclo de replicación; de esta manera impedirían la expresión de genes del ciclo lítico viral; de otra forma su aumento favorecería la permanencia del virus en estado de latencia (12).

Un análisis mas detallado ha permitido observar que estos transcritos difieren de los mRNA tradicionales,

en que no poseen Cap (cubierta protectora en el extremo 5'), ni cola de poliA (poliadeninas en el extremo 3'); lo anterior ha hecho suponer que se trata de segmentos agrupados de intrones que no estarían codificando para la síntesis de proteínas. A pesar de lo anterior se ha podido determinar que los Lat's si contienen Marcos de Lectura Abiertos (ORFs) o sitios de inicio de la lectura para la traducción en proteínas, separados por intrones (regiones no codificantes). De acuerdo con esto se ha propuesto que tales fragmentos podrían sufrir un "*splicing*" alternativo (corte y procesamiento de los RNAs mensajeros) semejante al descrito para otros agentes como los adenovirus y que serían capaces de dirigir la síntesis de alguna proteína que indujera el fenómeno de la reactivación (12,30).

En el bovino infectado latentemente con el HVB-1 también ha sido encontrada recientemente una pequeña región del genoma transcripcionalmente activa durante la latencia, denominada "*gen relacionado con latencia*" (LR) (31). Así mismo, se ha encontrado que la transcripción de estos LR está restringida a un fragmento de 1.16 Kb (0.740 a 0.748 unidades mapa). El análisis de secuencia del DNA de esta región reveló dos ORF mayores contra los cuales ha sido posible producir anticuerpos en conejos a través del uso de péptidos sintéticos. Posteriormente mediante el uso de estos anticuerpos en células líticamente infectadas se ha descubierto una proteína de 41 kd que podría estar involucrada en los mecanismos de la latencia viral, pero su función aún no ha podido ser determinada (14,17,31).

Aunque se ha propuesto que el RNA de estos LR's también podría jugar un papel en latencia viral al controlar la expresión de un gen IE sobrelapándolo, el papel funcional de estos transcritos en el establecimiento o el mantenimiento de la latencia sigue sin aclararse (31).

Es posible que las proteínas (específicas del virus o de la célula) requeridas para la activación de la transcripción de genes IE no estén disponibles en células que no se dividen tales como las neuronas, lo que podría contribuir al establecimiento y mantenimiento de la latencia, o que alternativamente, factores específicos de células neuronales (tales como el Factor de Crecimiento Neuronal - NGF) puedan

competir por tener un efecto negativo directo sobre factores transcripcionales positivos y así la latencia podría estar determinada por una combinación de todos estos elementos (18).

El Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) ha sido otro de los elementos recientemente implicado en la latencia, se trata de un péptido con acciones inmunes y endocrinas cuyo bloqueo o inhibición induce la reactivación en cultivos neuronales latentemente infectados con el HSV-1 (45).

Tal vez uno de los más grandes desafíos en la investigación de la latencia ha sido tratar de entender cómo un virus, eminentemente lítico, puede conducir a un estado de parasitismo en el cual la célula afectada sobrevive (por lo menos hasta una probable reactivación). Esto plantearía la necesidad de un control del ciclo replicativo del agente en su fase más temprana (durante la transcripción de genes Inmediatos Tempranos-IE o genes alfa, los cuales controlan y regulan la replicación viral). Se han postulado dos elementos candidatos para el cumplir esta función de control: Oct-2 (proteína de unión al octámero específica de neurona-linfocito) y los Lat's anteriormente mencionados (30).

Los factores relacionados con latencia podrían dividirse, de manera un poco arbitraria, en dos grupos:

♦ **Factores asociados al virus:**

- a) variación genética (cepas con diferente capacidad de reactivación) (4),
- b) características del ciclo replicativo (enzimas y proteínas del ciclo replicativo) (30) y
- c) situación física del genoma latente (integrado o episomal) (9,22)

♦ **Factores relacionados con el hospedero:**

- a) sistema inmune,
- b) asociación de haplotipos del HLA con patrón susceptibilidad/Resistencia (s/R) (28) y
- c) sistemas de control del organismo (neuronal y endocrino) (18).

A pesar de la innumerable cantidad de trabajos realizados para esclarecer los mecanismos involucrados en la latencia de los Herpesvirus son pocos los logros categóricos obtenidos. Los tres hechos más importantes en ese sentido podrían ser:

- ♦ No se requiere del ciclo de replicación viral para el establecimiento y mantenimiento de la infección latente (experimentos in vitro e in vivo lo demuestran) (12)
- ♦ Se requiere de un factor inhibidor, bloqueador o de control del ciclo lítico para inducir la latencia a nivel neuronal puesto que, como hasta el momento se ha demostrado, el virus solo se replica en forma lítica (30).
- ♦ La regulación de la latencia podría darse en un nivel más central, a través de la interrelación de los sistemas neuroendocrino e inmunológico, y no solamente por el sistema inmune como inicialmente se había sugerido. La anterior hipótesis se vería

favorecida por la consistencia de la reactivación por privación del Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) (4).

Finalmente, a pesar de que la mayor parte de los intentos realizados para producir una vacuna efectiva contra la infección primaria por herpesvirus, han sido relativamente infructuosos y los mecanismos implicados en la latencia distan mucho de ser totalmente entendidos, en los últimos años se ha generado un interés creciente en el desarrollo de una vacuna que pueda reducir el número y la severidad de las reactivaciones por Herpes Simplex 1 y 2 humanos (6).

En la actualidad se están desarrollando pruebas de eficacia de fase III utilizando una clona de la glicoproteína D2 de la envoltura viral del Herpes Simplex mezclada con adjuvante. Con base en esta vacuna se han obtenido resultados favorables hasta en un 30% de los ensayos (6). Esta nueva perspectiva de tratamiento en el hombre plantea una posibilidad de futura extrapolación para su aplicación en el campo veterinario.

## Summary

### *The Bovine Herpesvirus - 1: structure, replication and latency*

*The herpesviruses have been considered among the most complex viral families due not only to their size and their strict replication control but also because of their singular capacity for establishing latency and reactivation with or without clinical signs.*

*The present article reviews some aspects of the molecular structure of HVB-1, its replication and some of the mechanisms implicated in latency and reactivation of viral infection.*

## Referencias

1. BOLTON DC, CHUNG Z, ARDANS AA. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS- polyacrylamida gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 1983, 8: 57-68.
2. BYRNE KM, HOROHOV DW, KOUSOULAS KG. Glicoprotein B of bovine herpesvirus 1 binds heparine. *Virology.* 1995; 209:230-235.
3. CELEDON MO, OJEDA JM, MALMUS C. et al. A comparison of restrictive Endonuclease sites of bovine herpesvirus type 1 isolates in Chile. *J Vet Med B.* 1994; 41:460-466.
4. CENTIFANTO-FITZGERALD Y, CALDWELL D, YATES F. Herpes simplex virus: recurrent and nonrecurrent strains. *Proc Soc Exp Biol and Med* 1987; 185:484-492.
5. CHASE CC, LETCHWORTH III GJ. Bovine herpesvirus 1 gIV- expressing cells resist virus penetration. *J Gen Virol* 1994;75:177-181.
6. COHEN J. Vaccines get a new twist. *Science* 1994;264: 503-505.
7. DAVIES D, CARMICHAEL L. Role of Cell-Mediated

- Immunity in the Recovery of Cattle from Primary and Recurrent Infections with Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Infect Immunol.* 1973; Vol 8 No.4: 510-518.
8. DENNIS M. et al. Infectious Bovine Rhinotracheitis (Bovine Herpesvirus 1) Helper T cells, cytotoxic T cells and NK cells. En: *Cell - mediated immunity in ruminants.* Bélgica. CRC Press. 1994. p.p. 157-172
  9. DESHMANE S, FRASER N. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol* 1989; Vol 63 No.2: 943-947.
  10. DUBUISSON J, ISRAEL B, LECTCHWORTH III G. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. *J Gen Virol* 1992; 73: 2031-2039.
  11. FENNER F, BACHMAN P, GIBBS E, et al. *Veterinary Virology.* Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
  12. FIELDS B, KNIPE D. *Fields Virology.* 2a ed. New York: Raven Press, 1990. 2336p.
  13. HAANES EJ, THOMSEN DR, MARTIN S. et al. The bovine herpesvirus 1 maturational proteinase and scaffold proteins can substitute for the homologous herpes simplex virus type 1 proteins in the formation of hybrid type B capsids. *J Virol.* Nov 1995;7375-7379.
  14. HOSSAIN A, SCHANG LM, JONES C. Identification of Gene Products Encoded by Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus-1. *J Virol.* Sep 1995; 5345-5352.
  15. HUGHES G, BABIUK L, VAN DRUNEN LITTEL-VANDEN HURK S. Functional and topographical analysis of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Arch Virol.* 1988; 103: 47-60
  16. ISRAEL B, HERBER R, GAO Y, LETCHWORTH III J. Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus 1 replication in cattle. *Virol* 1992; 188: 256-264.
  17. JONES C. et al. Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1. *J Virol.* 1990; 64:1164.
  18. LEVI-MONTALCINI R, ALOE L, ALLEVA E. A role for nerve growth in nervous, endocrine and immune systems. *Progress in NeuroendocrinImmunol.* 1990; Vol 3 No.1: 1-10.
  19. LIANG X, BABIUK LA, ZAMB TJ. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing  $\beta$ -galactosidase: evaluation of the role of g-III in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virol.* 1992; 189:629.
  20. LIANG X. et al. Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virol.* 1993; 195: 42-50
  21. LIANG X, PYNE C, LI Y. et al. Delineation of the essential function of the bovine herpesvirus 1 gD: An indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virol.* 1995; 207:429-441.
  22. MELLERICK D, FRASER N. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virol.* 1987; 158: 265-275.
  23. MERCHANT I, PACKER R. *Bacteriologia y virologia Veterinarias.* 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1980; 763p.
  24. MILLER J, WHETSTONE C, VAN DER MAATEN M. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 1991; Vol 52 No.3: 458-461.
  25. MILLER J, WHESTONE C, BELLO L. et al. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet Res* 1991; 52: 1038-1043.
  26. MOHANTYS, DUTTAS. *Virología Veterinaria.* México: Interamericana, 1983. 412p.
  27. MOSIER DA, SIMONS KR, BRIGGS DJ, UHLICH GA. Lectin histochemistry of Normal and Herpesvirus-infected Bovine Nasal Mucosa. *Vet Pathol* 1995; 32:140-146.
  28. RAWLS W. Herpes Simplex 1 and 2. En: *Virology.* Fields B. New York: Raven Press 1985; p. 527-561
  29. ROCK D. Characterization of Dexamethasone-Induced Reactivation of Latent Bovine Herpesvirus-1. *J Virol.* Apr 1992; 2484-2490.
  30. ROCK D. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. *Seminars in Virol* 1993; 4: 157-165.
  31. ROCK D L. Latent infection with Bovine Herpesvirus Type 1. *Seminars in Vyrol.* 1994; 5:233-240.
  32. SEAL BS. et al. Relationship of bovine herpesvirus 1 immediate early early and late gene expression to host cellular gene transcription. *Virol.* 1992; 188:152
  33. SHEFFY B, DAVIES D. Reactivation of a Bovine Herpesvirus After Corticosteroid Treatment. *P.S.E.B.M.* 1972; 140: 974-976.
  34. SHIEH M, SPEAR P. Herpesvirus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heparan sulfate or soluble heparin. *J Virol.* 1994; Vol 69 No.2: 1224-1228.

35. SIMARD C, BASTIEN N, TRUDEL M. Sequencing and 5'- and - 3' end transcript mapping of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from bovine herpesvirus type 1. *Virology* 1992, 190: 698-701.
36. SMITH GA, YOUNG PL, REED KC. Emergence of a new bovine herpesvirus-1 strain in Australian feedlots. *Arch Virol* 1995; 140:599-603.
37. TENSER R, EDRIS W, HAY K. Neuronal control of herpes simplex virus latency. *Virology* 1993; 195: 337-347.
38. THAKER SR, STINE DL, ZAMB TJ et al. Identification of the putative cellular receptor for bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* 1994; 75:2303-2309.
39. TIKOO SK, CAMPOS M, BABIUK LA. Bovine Herpesvirus-1: Biology, pathogenesis and control. *Adv Virus Res* 1995; 45:191-223.
40. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, PARKER M, FITZPATRICK D. et al. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties. *J Virol* 1991; Vol 65 No.1: 263-271.
41. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, TIKOO S, LIANG X, BABIUK L. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Imm. and Cell Biol* 1993; 71: 405-420.
42. VAN DRUNEN LITTEL - VAN DEN HURK S. et al The role of the major tegument protein VP8 of bovine Herpesvirus - 1 in infection and immunity. *Virology* 1995; 206: 413-425.
43. VAN ENGELENBURG FA, KAASHOEK MJ, VAN OIRSCHOT JT. et al. A glucoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus-1 infects the same limited number tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J Gen Virol* 1995; 76:2387-2392.
44. WHESTONE C, MILLER J, SEAL B. et al. Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch Virol* 1992; 122: 207-214.
45. WILCOX C, JOHNSON E. Nerve Growth Factor deprivation results in the reactivation of latent herpes simplex virus in vitro. *J Gen Virol* 1987; Vol 62 No.7: 2311-2315.
46. WIRTH UV, VOGT B, SCHWYZER M. The three major immediate early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J Virol* 1991; 65:195.