

MECANISMO DE PERSISTENCIA DEL VIRUS RUBÉOLA EN INFECCIÓN CONGÉNITA
MECHANISM OF RUBELLA VIRUS PERSISTENCE IN THE CONGENITAL INFECTION
María P. Adamo, Mauro S. Pedranti, María J. Calloni Sappag, Marta T. Zapata.

RESUMEN

La rubéola congénita es una infección persistente. RUB no induce apoptosis en cultivos primarios de células fetales humanas (FFH), las que tienen un patrón de expresión de genes prevaleciente promotor de la supervivencia celular. Entre las vías de supervivencia y proliferación activas en FFH se encuentran las de Akt y ERK. Cuando se bloquea su activación RUB sí induce apoptosis y la infección no progresa. La inducción temprana y temporal de la activación de Akt y ERK en diversas líneas celulares en las que RUB sí induce apoptosis indica que la actividad de estas vías de supervivencia celular es necesaria para la replicación de RUB. Los cultivos de FFH persistentemente infectados con RUB también expresan p-Akt y p-ERK, pero en presencia de inhibidores específicos de estas quinasas el título viral cae significativamente. Consecuentemente vías de supervivencia / proliferación celular activas pueden contribuir a convertir la infección aguda por RUB en persistente. Asimismo se observan diferencias en el potencial apoptótico de cepas prototipos y salvajes, siendo estas últimas, no atenuadas, las que inducen efecto citopático (muerte celular) más acentuado. Así, la persistencia en la infección por RUB parece depender de múltiples factores tanto propios del virus como del hospedador, incluyendo la respuesta inmune y el background genético celular.

Palabras clave: rubéola, infección persistente, apoptosis.

ABSTRACT

Congenital rubella is a persistent infection. RUB does not induce apoptosis in primary cultures of human fetal fibroblasts (HFF), which have a prevailing gene expression background that promotes cell survival. Among the pathways promoting cell survival and proliferation active in HFF are Akt and ERK kinases pathways. When HFF are infected in the presence of inhibitors of Akt and ERK activation RUB does induce apoptosis in these cells and the virus infection does not grow. The early and temporal induction of the activation of Akt and ERK in diverse cell lines in which RUB induces apoptosis indicates that the activity of these survival pathways is necessary for RUB replication. Cultures of HFF persistently infected with RUB also express p-Akt and p-ERK, and when the activation of Akt and ERK is blocked by specific inhibitors, the viral titre falls significantly. Consequently, pathways of cell survival / proliferation can contribute to convert the acute RUB infection in a persistent infection. Likewise, prototype and wild type RUB strains show different apoptotic potential, the latter (not attenuated strains) inducing more conspicuous cytopathic effect (cell death). Thus, the persistence in RUB infection seems to depend on multiple, viral and host factors, including the immune response and the gene expression background of the infected cell.

Key words: rubella, persistent infection, apoptosis.

1. INTRODUCCIÓN

La rubéola es una enfermedad exantemática benigna típica de la niñez, que generalmente cursa sin presentar complicaciones y confiere inmunidad protectora de por vida. La infección en la mujer embarazada en cambio constituye un grave riesgo para el feto, especialmente durante el primer trimestre de gestación, por la capacidad teratogénica del virus. El virus rubéola (RUB) puede inducir un amplio rango de anomalías congénitas, en conjunto denominadas síndrome de rubéola congénita (SRC). Mientras la infección postnatal es limitada por la respuesta inmune del hospedador y se resuelve en el corto plazo, la rubéola congénita es persistente. El mecanismo de persistencia viral en la rubéola congénita no se conoce, pero la infección persistente se resuelve usualmente entre 1 y 2 años después del nacimiento (1-2).

Las vacunas a virus atenuado de RUB son efectivas y seguras y se han utilizado exitosamente en programas de vacunación por 30 años, lo que convierte a RUB en un atractivo vector vacunal (3). La dilucidación de las interacciones virus-célula es importante para comprender y predecir el comportamiento del virus en su aplicación tecnológica. Por ello el objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la persistencia de RUB en la infección congénita, analizando el rol de la apoptosis en la relación RUB-célula hospedadora.

2. El virus, la rubéola postnatal y la rubéola congénita.

RUB pertenece a la familia Togaviridae, siendo (hasta ahora) el único togavirus no-arbovirus y único representante del género Rubivirus. Posee un genoma de ARN infeccioso de cadena simple protegido por la cápside y una envoltura con dos glicoproteínas virales. El único hospedador y reservorio natural de RUB es el hombre y no existe un modelo animal para la rubéola congénita (4).

La infección por RUB en niños y adultos está caracterizada por exantema de corta duración, linfadenopatías, fiebre moderada y artralgias. Hay una alta proporción de casos subclínicos (2) y las complicaciones son infrecuentes (5).

RUB se transmite a través de aerosoles respiratorios. La incubación es seguida por viremia y liberación de partículas virales

infectivas en nasofaringe. La viremia cesa con la aparición de los anticuerpos circulantes. IgM es la primera en detectarse y la IgG confiere protección por el resto de la vida (1-2; 5-8).

En la primoinfección de una mujer embarazada, los tejidos placentarios son invadidos durante la viremia materna y la infección puede transmitirse de la madre al feto (9). La tasa de infección fetal es cercana a 90% en el primer trimestre de gestación (5). RUB se disemina ampliamente en los tejidos fetales (10-11), donde se establece una infección crónica y no lítica (9).

El 85% de los niños nacidos con rubéola materna confirmada en el primer trimestre de gestación presenta alguna o varias de las manifestaciones del SRC (1; 5), que incluyen patologías transitorias, daños estructurales permanentes y patologías de emergencia tardía. Las más comunes afectan sistema cardiovascular, sistema nervioso, ojos y oídos (5; 12).

Los niños con rubéola congénita excretan virus al momento del nacimiento y una proporción cada vez menor de ellos continuará haciéndolo los próximos 24 meses (13-15). Los factores que determinan la duración de la excreción viral no se conocen.

Los mecanismos teratogénicos tampoco están dilucidados, aunque resultados directos de la replicación del virus (crecimiento lento y depolimerización del citoesqueleto) durante períodos críticos de la ontogenia podrían dar lugar a las malformaciones del SRC (16-19). También podría contribuir cierto efecto lítico de RUB en las células embrionarias / fetales¹ (9; 20) y mediadores de la respuesta inmune (5; 21). La posible participación del proceso de muerte celular inducido por RUB en el mecanismo teratogénico se renovó después al describirse la capacidad de RUB de inducir apoptosis *in vitro* (22-23).

La persistencia de RUB en los tejidos fetales indica que ni los anticuerpos maternos ni los fetales pueden eliminar al virus *in utero*, aún cuando ambos pueden neutralizarlo *in vitro* (24). Los linfocitos de niños infectados durante la gestación muestran deficiencia proliferativa *in vitro* (25-27), pero producen IgM, IgA e IgG (28-30), por lo que no está claro cómo escapa

¹ Por simplicidad, en adelante el término fetal hará referencia también al período embrionario.

RUB a la eliminación y establece una infección persistente.

3. Hipótesis de persistencia viral en la infección congénita por virus Rubéola.

Varios mecanismos podrían explicar la persistencia de RUB en la infección congénita.

3A. Defecto en los mecanismos de defensa del hospedador.

La inmunotolerancia clásica (con ausencia de anticuerpos) no es una característica de la rubéola congénita, pero se han observado diferencias cualitativas en la respuesta de anticuerpos en las infecciones postnatal y congénita, y falla en la respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos de recién nacidos con rubéola congénita (25-27; 31). Esta deficiencia indica disfunción de la inmunidad mediada por células y podría conducir a la persistencia viral por falta de eliminación de las células infectadas.

3B. La hipótesis clonal.

Considerando la ausencia de potencial citolítico de RUB en células de cultivos crónicamente infectados que no se podían "curar" con antisuero específico, y evidencia de que el virus pasa a las células hijas durante la división celular, se propuso que se infecta un número limitado de células del embrión y que las células parentales infectadas dan lugar a clones de células infectadas, no siendo afectada la transferencia del virus por los anticuerpos circulantes. Los clones de células infectadas tendrían un potencial de duplicación reducido y al ir muriendo resultarían en la eliminación de la infección congénita (18).

3C. Efectos teratogénicos y persistencia intracelular del virus independientes.

La disfunción inmune sería consecuencia de la infección fetal y dependerá del tiempo de gestación al momento de la infección. La invasión del feto por RUB resulta en una población de células infectadas que tienen un tiempo de vida finito. Si la inmunidad celular es deficiente, las células infectadas sobrevivirán hasta completar su tiempo de vida determinado. El virus persistirá en tanto las células infectadas sobrevivan. Así, la duración de la infección está determinada por el tiempo de vida de la célula infectada y es influenciada secundariamente por mecanismos inmunológicos (32).

4. Influencia del *background* genético de la célula.

Entre 1998 y 2002 se demostró que RUB induce apoptosis con activación de caspasa 3 en cultivos (Vero, RK13, neuronas de ratón), que el efecto citopático (ECP) de RUB está mediado por la apoptosis y que la magnitud de apoptosis inducida varía entre tipos celulares (21-22; 33-36). Megyeri y col. (33), observaron apoptosis inducida por RUB en células Vero y RK13, pero no en dos líneas de fibroblastos embrionarios humanos (HEL-17 y HEL-18). Muchos virus activan sensores que desencadenan la apoptosis como respuesta innata frente a la infección viral (37-38). En este caso la apoptosis sería un mecanismo de defensa autónomo de la célula destinado a cortar el ciclo de replicación del virus y deshacerse de la célula infectada (39-40).

La apoptosis es un proceso clave en el desarrollo embrionario, en el que algunas células están programadas para morir, mientras que otras están determinadas para sobrevivir y proliferar (41-43). Estas células en activa proliferación tienen sus vías apoptóticas bloqueadas (44-45), por lo que *la expresión normal de oncogenes promotores de la supervivencia y la proliferación celular podría impedir la respuesta antiviral autónoma de la célula.*

5. Diferencias entre células fetales y de adulto humano y su respuesta a la infección por virus rubéola.

En cultivos de células Vero, las cepas Gilchrist (prototipo de laboratorio) y Córdoba (un aislamiento local de 1988 que carece del historial de pasajes de las cepas atenuadas prototipos o vacunales) difieren en su capacidad citopatogénica. A 5 dpi RUB Córdoba induce ~45% de muerte celular, mientras RUB Gilchrist induce ~30% (36; 46).

Para analizar el rol de la apoptosis en la infección por RUB se comparó el ECP inducido por RUB Córdoba en células Vero y células humanas derivadas de embrión y de adulto. Se establecieron cultivos primarios de fibroblastos fetales humanos (FFH) proliferantes, explantos de vellosidades coriónicas (EVC) y cultivos en monocapa de citotrofoblastos (CTB) de placentas a término, y se utilizaron también cultivos de células Hs888Lu, fibroblastos CCL-211, diploides derivados de pulmón humano de individuo adulto

(ATCC RUB induce moderado a marcado ECP (apoptosis) en Hs888Lu, EVC y en CTB, pero no en FFH (23; 47), y p-Jun [subunidad de un factor de transcripción implicado en la proliferación celular (49-51)] no se detectó en células Hs888Lu pero sí en FFH normales e infectadas (48). Por ello se analizó la expresión de genes en FFH y Hs888Lu, comparando los niveles de expresión en estos dos cultivos entre sí y en cultivos infectados versus controles correspondientes.

El análisis de expresión de genes en cultivos infectados permitió identificar ~500 genes inducidos o suprimidos por RUB en FFH y en Hs888Lu (de identidad diferente pero con un patrón de funciones similar); 5% de ellos participan en la defensa celular (respuesta innata, citoquinas, quemoquinas), y la mayoría de los restantes interviene en transducción de señales, regulación de la transcripción y metabolismo celular. Del análisis de los genes inducidos y suprimidos por RUB en células Hs888Lu surge que el patrón de expresión de genes en estas células promueve la apoptosis luego de la infección, en la cual la vía del IFN tiene una participación importante (23). La figura 1 muestra una síntesis esquemática de estos resultados

Fig. 1. A. en Hs888Lu infectados por RUB. **Inducción de IFN** El ARN viral de doble cadena generado durante la replicación reconocido por TLR3/4 B, que en el núcleo promueven la transcripción activa los factores IRF3 y NF- κ B. El IFN secretado se une a sus receptores en la superficie celular y de IFN desencadena la respuesta antiviral, incluyendo la expresión de OAS y MX, las que participan en la degradación de ARN y proteínas virales. IFN también induce la actividad de proteínas apoptóticas. **B.** IFN tipo I induce la transcripción de genes como FOXO3A, IL24, XAF-1, PML, caspasa (CASP) 10 y CASP4. CASP10 es una caspasa apical en la cascada enzimática que caracteriza a la apoptosis; es activada por señales transducidas desde los llamados "receptores de muerte" ubicados en la membrana plasmática. En su lado citoplásmico, estos receptores poseen "dominios de muerte" (DD, por *death domain*). Al unir sus ligandos, los receptores reclutan en el citoplasma, a través de sus dominios DD, moléculas que también poseen regiones DD, como FADD y TRADD. En la proximidad de la membrana plasmática se forma entonces el complejo DISC (*death inducing signaling complex*), que transmite la señal de muerte activando CASP8 o CASP10. Estas activan CASP3, que a su vez activa caspasas efectoras (CASP4, CASP6, CASP7). La vía intrínseca de la apoptosis involucra la activación de la CASP3 luego de la disrupción del potencial de membrana mitocondrial, acompañado de la liberación hacia el citoplasma de citocromo c. En el citoplasma, citocromo c, CASP9, Apaf-1 y ATP constituyen el apoptosoma que activa CASP3. Las vías extrínseca e intrínseca están conectadas por factores pro-apoptóticos activados por la vía de los receptores de muerte que pueden desencadenar la salida de citocromo c de la mitocondria, por ej. Bid. \rightarrow : activación o inducción; \dashv : inactivación o supresión (52).

En contraste, el patrón general de expresión de genes pro- y anti-apoptóticos luego de la infección es antagonista de la apoptosis en las células fetales: genes pro-apoptóticos que son inducidos por RUB en Hs888Lu no muestran cambios en su nivel de expresión en FFH o son inducidos en menor magnitud que en Hs888Lu (BAX, CARD6, CASP10, CASP7, CASP8), mientras que algunos genes anti-apoptóticos son inducidos (BCL2A1,

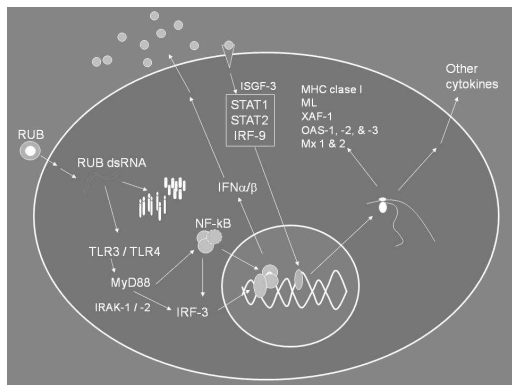


Fig. 1.A.

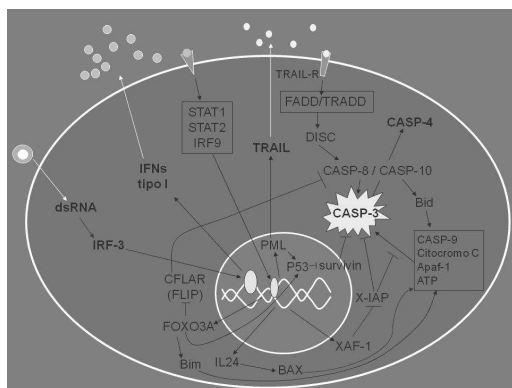


Fig. 1.B.

BIRC3) y otros pro-apoptóticos son suprimidos (TP53). No sólo es diferente la respuesta ante la infección por RUB en los genes que se activan o suprimen en FFH y Hs888Lu, sino también el patrón de expresión previo a la infección. Las células fetales tienen sobre-expresados genes anti-apoptóticos y sub-expresados genes pro-apoptóticos, de tal manera que el patrón de expresión de genes prevaleciente promueve la supervivencia en FFH (23). La figura 2 esquematiza sintéticamente la posible respuesta de células fetales a la infección por RUB en base a estos resultados.

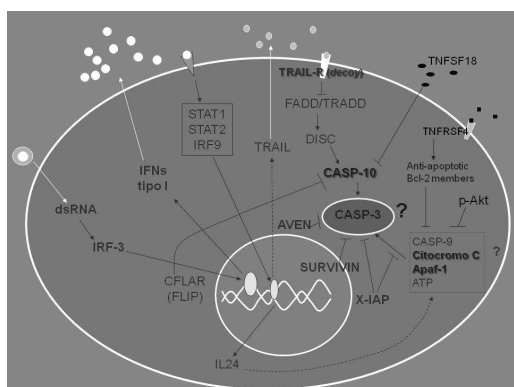


Fig. 2. La inducción del IFN es parte de la respuesta antiviral de la célula fetal, sin embargo la fase efectora de la apoptosis parece estar bloqueada por diversos mecanismos anti-apoptóticos [AVEN, SURVIVIN, TNFRSF4, TNFSF18, y TRAIL-R (decoy) están sobre-expresados en FFH y son anti-apoptóticos; CASP10, Citocromo c y APAF1 son pro-apoptóticos pero están sub-expresados en FFH con respecto a Hs888Lu]. →: activación o inducción; ⊥: inactivación o supresión (52). Las células FFH infectadas por RUB muestran además menor actividad de CASP3 que las células Vero infectadas (53). Más aún, el tratamiento de cultivos de FFH con varios compuestos químicos que inducen apoptosis por diferentes vías (actinomicina D, camptotecina, cicloheximida, dexametasona y etoposida) mostró que estas células fetales son relativamente resistentes a todos ellos excepto cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica), en contraste con lo que ocurre con Hs888Lu y Vero (23).

Entre los genes promotores de la supervivencia de la célula sobre-expresados en FFH destacan integrantes de las vías de la PI3K (*phosphoinositide 3 kinase*) y de las MAP-quinasas (MAPK,

mitogen activated protein kinases). En efecto, Akt (quinasa aguas abajo de PI3K) y ERK (una MAPK) están activas (p-Akt y p-ERK) en FFH. Si se infectan células FFH con la activación de Akt y ERK bloqueada por inhibidores específicos, RUB sí induce apoptosis en ellas. Además, la infección puede establecerse inicialmente en presencia de inhibidores de la fosforilación de Akt y ERK, pero luego del segundo día post-infección el título viral cae significativamente y la infección no progresa. Similares resultados se obtuvieron con cultivos FFH persistentemente infectados (53-54; Adamo y col., manuscrito en preparación). En conjunto, los datos sugieren que las vías PI3K-Akt y Ras-Raf-MEK-ERK activas en FFH colaboran en determinar el estado de supervivencia de FFH y permitirían el establecimiento de la infección persistente por RUB.

6. Rol de la apoptosis en la infección por virus rubéola.

La capacidad de RUB para inducir apoptosis en distintos tipos celulares difiere según su grado de diferenciación (y no proliferante). Además RUB induce la activación de Akt y ERK en células Vero, BHK-21, Hs888Lu (Adamo y col., manuscrito en preparación) y RK-13 (55), aunque sólo de manera transitoria y previo a la aparición de ECP (apoptosis) en el cultivo. Ello indica que la apoptosis inducida por RUB es un mecanismo innato de defensa contra la infección viral, autónomo de la célula. Como otros virus, RUB habría encontrado una vía para escapar a este mecanismo de defensa, prolongando la vida de la célula el tiempo suficiente para completar su ciclo.

Dado que se observan diferencias en el potencial apoptogénico de diferentes cepas de RUB, siendo más citopatogénicas las cepas salvajes que las cepas atenuadas prototipos (36; 47; 52; Adamo y col., manuscrito en preparación), el grado de atenuación viral también influye en su habilidad para sobrepasar el umbral de detección de la infección e inducción de la respuesta antiviral. Aún no se sabe qué factores influyen en la capacidad apoptogénica de RUB. Hasta ahora no se encontraron dominios en las proteínas virales capaces de interactuar con proteínas celulares para inducir apoptosis por vía intrínseca, pero experimentos en los que se bloquea la

actividad del IFN sugieren que existe un mecanismo por el que RUB induce apoptosis independiente de la vía del IFN (23).

CONCLUSIÓN

La persistencia de RUB en la infección congénita parece resultar fundamentalmente de la falla de la respuesta citotóxica fetal y del tiempo de vida de las células infectadas, determinado por su patrón de expresión de genes. Durante la infección embrionaria o fetal, algunas células infectadas podrían morir por apoptosis, en tanto otras, determinadas a sobrevivir y proliferar (con sus vías apoptóticas bloqueadas) no activarían el programa de muerte como defensa contra virus. En este caso, la expresión normal de oncogenes promotores de la supervivencia y la proliferación celular bloquearía la apoptosis inducida por RUB. Es decir que genes que determinan el destino a sobrevivir y proliferar de las células durante el desarrollo embrionario podrían promover la persistencia de RUB en la infección congénita.

BIBLIOGRAFÍA

1. Banatvala J E, Brown D W G. Rubella. *Lancet*; 2004, 363:1127-1137.
2. Zapata M. Virus de Rubéola. EN Basualdo JA, Cotto CE, De Torres RA (eds): *Microbiología Biomédica*. Atlante SRL. Buenos Aires. 2006. Capítulo 92, p910-917. 3ra ed.
3. Pugachev K V, Tzeng W P, Frey T K. Development of a Rubella virus vaccine expression vector: use of a picornavirus internal ribosome entry site increases stability of expression. *J Virol*; 2000, 74:10811-10815.
4. Frey T K. Molecular biology of Rubella virus. *Adv Virus Res*; 1994, 44:69-160.
5. Wolinsky J S. Rubella. EN Fields B N, Knipe D M, Howley P M. et al. (eds): *Fields Virology*. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1996, p899-929. 3rd ed.
6. Córdoba P A. Mecanismos de neutralización de la infectividad viral y relación funcional de dos epitopes de la glicoproteína E1 en distintas cepas de virus Rubéola. Tesis Doctoral. 1997. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.
7. Terry G M, Ho-Terry L, Londesborough P, Res K R. Localization of the Rubella E1 epitopes. *Arch Virol*; 1988, 98:189-197.
8. Wolinsky J S, McCarthy M, Allen-Cannady O, Moore W T, Jin R, Cao S N, Lovett A, Simmons D. Monoclonal antibody defined epitope map of expressed Rubella virus protein domains. *J Virol*; 1991, 65:3986-3994.
9. Tondury G, Smith D W. Fetal rubella pathology. *J Pediatr*; 1966, 68:867-879.
10. Alford C A, Neva F A, Weller T H. Virologic and serologic studies on human products of conception after maternal rubella. *New Engl J Med*; 1964, 271:1275-1281.
11. Bellanti J A, Artenstein M S, Olsen L C, Buescher E L, Luhrs C E, Milstead K L. Congenital rubella: clinicopathologic, virologic and immunologic studies. *Am J Dis Child*; 1965, 110:464-472.
12. Cooper L Z. The history and medical consequences of rubella. *Rev Infect Dis*; 1985, 7(Suppl 1):S2-S10.
13. Katow S. Rubella virus genome diagnosis during pregnancy and mechanism of congenital rubella. *Intervirology*; 1998, 4:163-169.
14. Malathi J, Therese K L, and Madhavan H N. The association of rubella virus in congenital cataract – a hospital-based study in India. *J Clin Virol*; 2001, 23:25-29.
15. Phillips C A, Melnick J L, You M D, Bayatpour M, Burkhardt M. Persistence of virus in infants with congenital rubella and in normal infants with a history of rubella. *J Am Med Ass*; 1965, 193:1027-1029.
16. Rawls W E, Desmyer J, Melnick J L. Virus carrier cells and virus-free cells in fetal rubella. *Proc Soc Exp Biol Med*; 1968, 129:479-483.
17. Rawls W E. Viral persistence in congenital rubella. *Prog Med Virol*; 1974, 18:273-288.
18. Rawls W E, Melnick J L. Rubella virus carrier cultures derived from congenitally infected infants. *J Exp Med*; 1966, 123:795-816.
19. Bowden D S, Pedersen J S, Toh B H, Westaway E G. Distribution by

- immunofluorescence of viral products and actin-containing cytoskeletal filaments in Rubella virus infected cells. *Arch Virol*; 1987, 92:211-219.
20. Neva F A, Alford C A, Weller T H. Emerging perspective of rubella. *Bacteriol Rev*; 1964, 28:444-451.
 21. Adamo M P, Zapata M, Frey TK. Analysis of gene expression in fetal and adult cells infected with rubella virus. *Virology*; 2008, 370:1-11.
 22. Pugachev K V, Frey T K. 1998. Rubella virus induces apoptosis in culture cells. *Virology* 250, 359 – 370.
 23. Duncan R, Muller J, Lee N, Esmaili A, Nakhasi H L. Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-X_L and caspase inhibitors. *Virology*; 1999, 255:117-128.
 24. Cooper L Z, Ziring P R, Ockerse A B, Fedum B A, Kiely B, Krugman S. Rubella: clinical manifestations and management. *Am J Dis Child*; 1969, 118:18-29.
 25. Buimovici-Klein E, Cooper L Z. Cell-mediated immune response in rubella infections. *Rev Infect Dis*; 1985, 7(Suppl 1):S123-S128.
 26. Buimovici-Klein E, Lang P B, Ziring P R, Cooper L Z. Impaired cell-mediated immune response in patients with congenital rubella: correlation with gestational age at time of infection. *Pediatrics*; 1979, 64:620-626.
 27. Fuccillo D A, Steele R W, Hensen S A, Vincent M M, Hardy J V, Bellanti J A. Impaired cellular immunity to rubella virus in congenital rubella. *Infect Immunity*; 1974, 9:81-84.
 28. Enders G. Serologic test combinations for safe detection of rubella infections. *Rev Infect Dis*; 1985, 7(Suppl 1):S113-S122.
 29. Grangeot-Keros L, Pillot J, Daffos F, Forestier F. Prenatal and postnatal production of IgM and IgA antibodies to Rubella virus studied by antibody capture immunoassay. *J Infect Dis*; 1988, 158:138-143.
 30. Ueda K, Tokugawa K, Fukushige J, Yoshikawa H, Nonaka S. Hemagglutination inhibition antibodies in congenital rubella syndrome: a 17-years follow-up in the Ryukyu Islands. *Am J Dis Child*; 1987, 141:211-212.
 31. Olson G B, Dent P B, Rawls W E, South M A, Montgomery J R, Melnick J L, Good R A. Abnormalities of in vitro lymphocyte responses during rubella virus infections. *J Exp Med*; 1968, 128:47-68.
 32. Simons M J. Congenital rubella: an immunological paradox? *Lancet*; 1968, 2:1275-1278.
 33. Megyeri K, Berencsi K, Halazonetis T D, Prendergast G C, Gri G, Plotkin S A, Rovera G, Gonczol E. Involvement of a p53-dependent pathway in rubella virus-induced apoptosis. *Virology*; 1999, 259:74-84.
 34. Hofmann J, Pletz M W, Liebert U G. Rubella virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis. *J Gen Virol*; 1999, 80:1657-1664.
 35. Domegan L M, Atkins G J. Apoptosis induction by the Therien and vaccine RA27/3 strains of rubella virus causes depletion of oligodendrocytes from rat neural cell cultures. *J Gen Virol*; 2002, 83:2135-2143.
 36. Martinez L D, Zapata M T. Apoptosis induction by the infection with Gilchrist strain of rubella virus. *J Clin Virol*; 2002, 25:309-315.
 37. O'Brien V. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol*; 1998, 79:1833-1845.
 38. Roulston A, Marcellus R, Branton P E. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol*; 1999, 53:577-628.
 39. Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol*; 1999, 7:160-165.
 40. Koyama A H, Adachi A. Physiological significance of apoptosis during animal virus infection. *Int Rev Immunol*; 2003, 22:341-359.
 41. Ellis R E, Yuan J, Horvitz H R. Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol*; 1991, 7:663-698.
 42. Jurisicova A, Acton B M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*; 2004, 128:281-291.

43. Oligny L L. Human molecular embryogenesis: an overview. *Pediatr Dev Pathol*; 2001, 4:324-343.
44. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner E F. Control of cell cycle progression by c-jun is p53 dependent. *Genes Dev*; 1999, 13:607-619.
45. Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner E, Karin M. The mammalian UV response: c-jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*; 2000, 103:897-907.
46. Adamo M P, Leon Monzon M, Cuffini C, Pedranti M, Zapata M. Detection of rubella-virus-induced apoptosis in Vero cell cultures with hematoxylin and eosin staining. *Rev Argent Microbiol*; 2002, 34:177-185.
47. Adamo P, Asis L, Silveyra P, Cuffini C, Pedranti M, Zapata M. Rubella virus does not induce apoptosis in primary human embryo fibroblast cultures: a possible way of viral persistence in congenital infection. *Viral Immunol*; 2004, 17:87-100.
48. Adamo M P, Zapata M, Frey T. Análisis de expresión de genes en células de embrión y de adulto humano infectadas por el virus Rubéola: implicancias para la persistencia viral en la infección congénita. XIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo. Argentina, 31 Ago.-2 Sept. 2005. Trabajo completo en CD. Resúmenes ND1007, p142.
49. Eferl R, Sibilina M, Hilberg F, Fuchsbichler A, Kufferath I, Guertl B, Zenz R, Wagner E F, Zatloukal K. Functions of c-jun in liver and heart development. *J Cell Biol*; 1999, 145:1049-1061.
50. Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam S J, Bauer A, Karin M, Wagner E F. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun dependent cell proliferation. *Mol Cell*; 2004, 15:713-725.
51. Sabapathy K, Wagner E F. JNK2 a negative regulation of cellular proliferation. *Cell Cycle*; 2004, 3:1520-1523.
52. Adamo M P. Estudio de un mecanismo de persistencia del virus rubéola en la rubéola congénita. Tesis Doctoral. 2006. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.
53. Adamo M P, Pedranti M, Zapata M, Frey T. Participación de vías celulares de supervivencia y proliferación en la infección por virus Rubéola. XXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Córdoba, Argentina, 2-5 Dic. 2007. Libro de Actas p19, resumen 22462.
54. Adamo M P, Pedranti M, Zapata M. Las vías PI3K-Akt y Ras-Raf-MEK-ERK bloquean la apoptosis inducida por el virus Rubéola en células fetales humanas: un modelo de persistencia viral en la infección congénita. XIV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo. Brasil, 13-15 Sept. 2006. Trabajo completo en CD. Libro de Actas p502, resumen ND7010.
55. Cooray S, Jin L, Best J M. The involvement of survival signalling pathways in Rubella-virus induced apoptosis. *Virology*; 2005, 2:1. <http://www.virologyj.com/content/2/1/1>.