



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Protección de Ratones Endogámicos Cepa C-57 contra la Rabia por medio de la Inmunidad Adoptiva.

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a :

Héctor Manuel Pérez Romero

8092

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES:

**Sra. Josefina Romero de Pérez.
Sr. Euéldes Pérez Hernández.**

**Por haber forjado en mi a un
Profesionista.**

A MI ESPOSA:

Martha Magaña de Pérez.

Por su amor y comprensión.

A MI HIJA:

Deyanira.

Con todo cariño.

A MIS HERMANOS:

**Elvia
Addy
Francisco
Alvaro**

**Por su ayuda que me
brindaron.**

A MIS ASESORES:

Dr. Eliseo Hernández Baumgarten
Dr. José Manuel Berruecos Villalobos

Con eterna gratitud.

A MI JURADO:

Dr. Rene Frappe Muciño.
Dr. Gustavo de la Colina y Rojo.
Dr. Santiago Aja Guardiola.
Dr. José A. Zozaya.
Dr. José Manuel Berruecos V.

I N D I C E

- I.- INTRODUCCION
- II.- MATERIAL Y METODOS
- III.- RESULTADOS
- IV.- DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA

PROTECCION DE RATONES ENDOGAMICOS CEPA C-57
CONTRA LA RABIA POR MEDIO DE LA INMUNIDAD -
ADOPTIVA.

I N T R O D U C C I O N

La Rabia es una Enfermedad Infecciosa del Sistema Nervioso Central causada por un virus (10). El virus rábico en cultivos celulares se comporta como un virus no citopático (8), o bien, causa un bajo nivel de citopatogenicidad celular (8), lo cual resulta un tanto sorprendente dado el alto grado de mortalidad asociado con la infección de animales de sangre caliente con este virus (10). Existen en la literatura informaciones de rabia abortiva en diversas especies animales (4,11) e incluso el hombre. Los mecanismos de protección preventiva resultan particularmente interesantes ya que es posible obtener un alto porcentaje de ratones con rabia abortiva si se inoculan por vía intracerebral con virus HEP- (4), que es un virus no patógeno para ratones de 21 --

días, y si varios días después se inocula por vía intramuscular con una cepa virulenta. Los ratones muestran síntomas de rabia a su debido tiempo, pero sin que un alto porcentaje de ellos se recuperen, si bien mostrando importantes alteraciones en el sistema nervioso central durante la fase de recuperación (4). Este tipo de observaciones ha hallado una confirmación accidental en un laboratorista que había sido vacunado y que como consecuencia de una exposición al virus rábico, mostró síntomas clínicos y después se recuperó (13).

Los medios de protección antirrábica tanto para el hombre como para los animales (3), han sido conocidos desde hace poco menos de 100 años y han sido objeto de numerosas modificaciones en cuanto a la calidad y pruebas de control a que se sujetan dichos productos (3). La disponibilidad de buenas vacunas para uso en animales hace de la rabia humana una enfermedad prevenible en cuanto los animales son la fuente de infección para el hombre sin embargo el estado de conocimiento no es igualmente adecuado en el

cuanto a los mecanismos de protección. La inmunidad humoral ha sido tradicionalmente la forma de evaluar el estado de inmunidad de individuos vacunados (1). Sin embargo, el título de anticuerpos no basta para explicar en todos los casos el comportamiento al desafío, ya que ocurre que animales aparentemente inmunes mueren, en tanto que animales sin anticuerpos detectables sobreviven (8). Una posible explicación a este fenómeno pudiera residir en la inmunidad celular, que no siempre se comporta paralelamente a la inmunidad humoral y que en general no se mide. La prueba de inmunidad adoptiva se empleó en el presente trabajo con la idea de arrojar un poco de luz sobre la patogenesis de la rabia y los mecanismos de protección del animal inmune y determinar las posibilidades de obtener una inmunidad pasiva por medio del trasplante de linfocitos.

MATERIAL Y METODOS

- A.- Cepas de Ratones.- Se utilizaron 2 cepas diferentes de ratones, los ratones suizos blancos CD-1 proporcionados por el Bioterio del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.(I.N.I.P.) y los ratones negros endogámicos cepa C-57 procedentes del Bioterio del Departamento de Derriengue, INIP, SARH.
- B.- Cepa de Virus.- Se empleó una cepa de virus fijo de rabia C.V.S.* obtenido originalmente del Instituto Winstar de Philadelphia, para este trabajo se preparó un lote de virus con la técnica descrita por Dean 1966 (7).
- C.- Vacuna.- La vacuna que se utilizó para este trabajo fué la V-319/Acatlán, desarrollada en el I.N.I.P. (7,8) y para los propositos de este experimento, se

* C.V.S.- Cepa de virus de exposición.

obtuvo del Departamento de Producción del I.N.I.P., 100 ampolletas liofilizadas de vacuna comercial del lote 74/F con un título de $10^{-7.3**}$ UFP/ml. Se tituló el lote de C.V.S. en ratones blancos CD-1 y negros C-57 de 6 semanas de edad, por vía intramuscular, abarcando margenes de 10^{-1} a 10^{-5} inoculando 6 ratones por dilución con 0.1 ml. de inóculo, observandose diariamente durante 21 días.

Se determinó la dosis 80-100% inmunizante para ambas cepas de ratones, vacunándolos por vía intraperitoneal con diluciones 10^{-1} a 10^{-4} de la vacuna (200000UFP) y desafiándolos 30 días después con 100 DL₅₀ ratón de C.V.S.

Para la prueba de inmunidad adoptiva se vacunaron cuatro lotes de 40 ratones de 21 días de cada cepa.

El primer lote se conservó como testigo vacunado y

** U.F.P. / Unidades Formadoras de placa.

fue desafiado 30 días después de la vacunación. Los otros tres lotes de ratones fueron sacrificados a los 30 días de la vacunación y se procedió a extraer asepticamente el bazo. Las células del bazo fueron obtenidas en medio de mantenimiento BME más 2% de suero. El procedimiento de extracción de linfocitos de bazo fue de acuerdo a las técnicas descritas por Wilson D.B. 1967 (16), se procedió a efectuar una cuenta viable y se inoculó por vía intraperitoneal la totalidad de las células obtenidas del bazo de un ratón a un ratón de cepa homóloga, no inmunizado de 21 días de edad. Se llamó a los animales sacrificados donadores de linfocitos y receptores a los animales que se inocularon con los linfocitos inmunes.

Para cada lote de animales donadores se formó un lote de animales receptores, o sea que se contó con tres lotes de animales receptores. Al primer lote de 30 ratones se le desafió un día después de recibir los linfocitos inmunes. Al segundo lote de receptores, se les desafió a los 7 días de recibir los linfocitos y al tercer lote se le desafió a los 12 días de recibir los linfocitos inmunes. Todos los desafíos --

fueron efectuados por vía intramuscular con virus C.V.S. con 100 DL₅₀ ratón contenidos en 0.1 ml. de inóculo. Diez ratones de cada uno de los lotes receptores fueron sangrados al momento de hacer el desafío.

El suero obtenido de estos animales así como de 10 testigos vacunados, se empleó para pruebas de sueroneutralización en reducción de placas, de acuerdo a las técnicas descritas por Atanasiu, 1966, Sedwick y Wiktor, 1967. --- (2,12,15).

R E S U L T A D O S

El lote de C.V.S. preparado para este estudio tuvo un título por vía intramuscular de $10^{4.7}$ DL₅₀ o sea 5000 dosis 50% totales para ratón. Una dilución 1:5 contenía 1000 dosis totales por ml. o sea los requeridos 100 DL₅₀ en cada 0.1 ml. de inóculo. Esta fue la dosis usual de desafío utilizada en todo el estudio.

Los ratones blancos cepa CD-1 murieron en su totalidad independientemente del tiempo transcurrido entre la transferencia de linfocitos y el desafío. En el único lote de ratones de esta cepa en que se observó un 87.2% de protección fue en el lote testigo vacunado, que fue desafiado 30 días después de la vacunación y tenía su título promedio de 1:123 P.R.T.* de anticuerpos en su suero.

Ninguno de los lote homólogos de receptores de linfocitos tenía títulos detectables de anticuerpos en su suero.

*P.R.T.- Prueba de reducción de placas.

La dosis mínima inmunizante 80-100% de la vacuna - fue determinada en 0.5 ml. de la vacuna diluida 1:100, - tomando la pastilla liofilizada como de 1 ml. y reconstituida con 10 ml. de solución salina fosfatada pH 7.2 a 4°C inmediatamente antes de la vacunación.

Los resultados de la prueba de inmunidad adoptiva - en ratones negros C-57 se anotan en el cuadro No. 1.

En la grafica No. 1 se anotan los datos del cuadro - No. 1 para su mejor representación visual.

En el Cuadro No. 2 se anotan los datos de tiempo de sobrevida en los animales que murieron como consecuencia del desaffo.

Cuadro 1

**RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNIDAD ADOPTIVA
EN RATONES CEPA C 57**

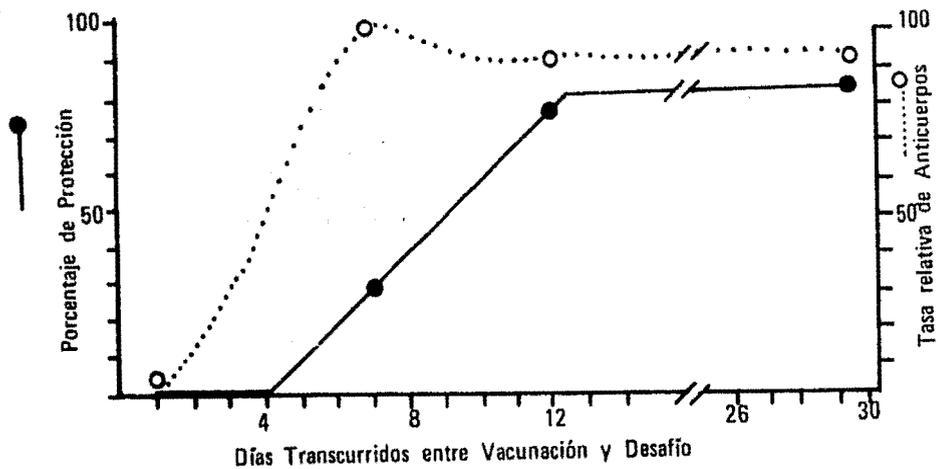
| LOTE | Protección al desafío | Título de S N (1)) |
|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Testigo no vacunado | 0 % | 1:10 ⁽²⁾ |
| Testigo vacunado | 81.25 % | 1:123 |
| Receptor de 12 días | 75.0 % | 1:160 |
| Receptor de 7 días | 28.0 % | 1:389 |
| Receptor de 1 día | 0.07 % | 1:10 |

(1) Resultado de seurneutralización por reducción en placa

(2) Dilución de suero que causó una reducción del 50 de las placas.

RESULTADOS DE LA INMUNIDAD ADOPTIVA EN RATONES CEPA C 57

Gráfica 1



Cuadro 2

**TIEMPO DE SOBREVIDA DE LOS RATONES CEPA- 57 QUE MURIERON
COMO CONSECUENCIA DEL DESAFIO**

| Lote de ratones | Tiempo en horas y desviación estándar (1) |
|---------------------|-------------------------------------------|
| Testigo no vacunado | 176 \pm 101 |
| Testigo vacunado | 300 \pm 126.4 |
| Receptor de 12 días | 288 \pm 115.2 |
| Receptor de 7 días | 264 \pm 92.2 |
| Receptor de 1 día | 192 \pm 148.7 |

(1) no hubo diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de supervida.

DISCUSION

En experiencias previas, Wiktor (14,15) trabajando con ratas parabióticas observó que si vacunaba a una de las dos ratas y luego las separaba y desafiaba ocurría que solo el animal vacunado estaba activamente protegido, en tanto que la pareja parabiótica no lo estaba. Wiktor (14,15) parece considerar que los anticuerpos juegan un papel más importante que la inmunidad celular, especialmente las células del bazo ya que la esplectomía no tiene influencia en los resultados del desafío. Además, no fué capaz de transferir la inmunidad de una rata vacunada a una receptora con células del bazo.

Los ratones cepa CD-1, siendo heterogeneos desde el punto de vista de sus antígenos tisulares, no recibieron el trasplante de células inmunes, por lo cual se observó producción de anticuerpos ni protección como consecuencia del trasplante. Los ratones cepa C-57, por el

contrario, tratándose precisamente de una cepa de ratones con antígenos tisulares homólogos, si aceptaron el trasplante de células inmunes.

La prueba que aquí se comunica sirve como confirmación de la condición de los antígenos tisulares de las dos cepas de ratones empleados en el estudio. Dado que los ratones- cepa CD-1 solo se incluyeron como testigos de la cepa --- C-57, el resto de la discusión se limitará a los resultados obtenidos con esta última.

Puede notarse en el cuadro No. 2 que los tiempos de so brevida de los ratones no fué alterada por las diversas ma nipulaciones a que se sujetaron los lotes de ratones, es de cir, no hubo tendencia a crear las condiciones favorables - la presentación de rabia abortiva.

En caso de que la inmunidad celular fuera importante en la protección activa de los animales, el trasplante de celu-- las inmunes esplélicas (formadas así como células plásma ticas principalmente por una mezcla de linfocitos (T y B) -

deberían haber establecido inmediatamente un nivel de protección comparable al de los ratones inmunes.

Sin embargo, como puede verse en el Cuadro No. 1 y - la Grafica No. 1, este no es el caso; la protección es nu- la un día después del trasplante. La protección parece, - con el limitado número de observaciones de este Estudio, iniciarse a los cuatro días del trasplante (Grafica 1) para estabilizarse alrededor de los 13 días en el máximo obser- vado. Deberá recordarse que esto no es un caso de inmu- nidad primaria sino un caso de inmunidad adoptiva, es de cir, el comportamiento de células inmunes en un receptor virgen. El hecho de que los animales receptores no hayan permitido una elevación más rápida del nivel de protec- ción, podría ser causado por la lenta penetración de los- linfocitos de la cavidad peritoneal al sistema linfático así como por el hecho de que el sistema inmunitario de los - receptores se hallaba intacto, es decir, que no se halla- ban inmuno deprimidos y por lo tanto el sistema linfático receptor se encontraba en niveles cercanos al máximo de población, con poco espacio adicional para permitir una -

mayor proliferación de linfocitos inmune.

La rápida elevación de la tasa de anticuerpos sigue una curva completamente diferente a la de protección. En este caso si se observa una rápida elevación de los títulos de anticuerpos. Aquí resulta más evidente que en otros casos el hecho de que el título de anticuerpos circulantes, producidos activamente por las células trasplantadas necesitan alcanzar un nivel mínimo para ser útiles en la protección antirrábica. Notese por ejemplo (Grafica 1) que los ratones que recibieron las células inmunes siete días antes, no tenían más que un 25% de protección en tanto que su título de anticuerpos circulantes fue el más alto de los observados.

En este título de anticuerpos, desde luego no fué estadísticamente diferente de los observados en los otros animales inmunizados, pero si indica que hay un lapso de seis días entre el tiempo en que se llega al máximo nivel de anticuerpos y se establece el máximo de protección compatible con las condiciones del experimento.

Existe una aparente discrepancia entre nuestros resultados y los de Wiktor (14,15) en el sentido de que no pudo observar transferencia de inmunidad por medio del trasplante de células esplénicas.

Desafortunadamente las dos pruebas no son directamente comparables dado que Wiktor (14,15) no especifica ni la vacuna empleada, ni el tiempo transcurrido después de la vacunación antes de colectar el bazo ni el tiempo transcurrido después del trasplante.

Si Wiktor (14,15) trabajó bajo la suposición de que la inmunidad adoptiva debería establecer de inmediato un alto nivel de protección, sus resultados serían comparables a los nuestros en el lote de receptores de un día. Wiktor (14,15) considera que sus resultados serían comparables a los nuestros en el lote de receptores de un día. Wiktor (14,15) considera que sus resultados con ratas parabióticas significan que se requiere de un lapso de varios días para que los anticuerpos circulantes se fijan a los tejidos del parabionte no vacunado para establecer en él la protección.

Los resultados que aquí se comunican también permiten observar este período de varios días entre la presencia de anticuerpos y el establecimiento de la protección (período de incubación de protección), sin embargo pudiera tener una explicación diferente a la ofrecida por Wiktor (14,15).

Los estudios con rabia abortiva mencionados antes -- (14,15) apuntan hacia la producción local de anticuerpos en el sistema nervioso central como punto crucial en la protección.

Ningún tipo de vacuna y método de vacunación periférica actualmente en uso, causa un aumento del título de anticuerpos en el líquido cefalo raquídeo. En los pocos casos de rabia abortiva humana, se ha observado un título de anticuerpos rábicos en el líquido cefalo raquídeo paralelo aunque no igual al que se encuentra en el suero (13), aún cuando ya se ha mencionado la posible influencia de la barra peritoneo-linfática para explicar el retraso en la presentación de los anticuerpos, una vez que los linfocitos inmunes han llegado a la linfa todavía tienen que atravesar-

la barrera hemato-encefálica antes de que sea posible la -
producción local de anticuerpos.

Los linfocitos inmunes tienen que estar en condiciones de acudir al llamado de emergencia del encéfalo lanzado - por las células de la médula espinal en donde se asienta - la primoinfección. En este fenómeno el período de incubación de protecciones el que podría explicar en forma compatible con el cuadro general de observaciones sobre -- protección antirrábica y rabia abortiva.

CONCLUSIONES

- 1.- Es posible establecer la inmunidad adoptiva contra la rabia en ratones histocompatibles.
- 2.- No es posible establecer la inmunidad adoptiva en ratones inmunológicamente heterogéneos.
- 3.- Se requiere de un mínimo de cuatro días y un máximo de trece días para establecer la inmunidad adoptiva en ratones negros C-57.
- 4.- Las observaciones de este estudio indican que el factor más importante en la protección antirrábica es la producción de anticuerpos y no la inmunidad celular.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- ARELLANO S, C., P. SUREAU, D. BATALLA C. Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa -- ERA en bovinos: I. Antigenicidad. Tec. Pec. Mex. 18: - (1971): 12-15.
- 2.- ATANASIU, P. - Quantitative assay and Potency test - of antirrabies serum. Capitulo 22 de Técnicas de Laboratorio en Rabia Serie Monográfica, No. 23, 2nd. Ed. - (1966): 167-172.
- 3.- BAER, G.M. The natural history of rabies. Vol. II. - Academic Press. Capítulos 11, 13, 15, 20 y 21 (1975).
- 4.- BELL, J.F., Latency and abortive rabies in the natural history of rabies. Academic Press, 331-355. (1975).
- 5.- BIJLENGA G. and E. HERNANDEZ B. a Adaptation. -- Attenuation and plaque purification of a Rabies isolate - from a vampire bat (Desmodus rotundus). Enviado a -- The Cornell Veterinarian). (1978 a).

- 6.- BIJLENGA G. and E. HERNANDEZ B. Testing of the vaccine potencial of the plaque purified rabies virus -- strain V319 derived from a vampire bat (Desmodus rotundus) in México enviado a The Cornell Veterinarian.- (1978 b).

- 7.- DEAN, D.J. 1966, The Nylar test for measuring potency of antirrabies vaccine, capitulo 20. Técnicos de Laboratorio en rabia, serie monográfica No. 23, 2ad. ed. 157.

- 8.- Hernández B., E., J. MORALES, C. ARELLANO, J. CAMPOS, B. LOPEZ y H. PEREZ. 1976. Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada para bovino producida en cultivos celulares. Tec. Pec. en México.- 30, 57-63.

- 9.- HERNANDEZ B., E.M., La rabia pareasiente bovina: - Definición del problema y metodología de control. Ciencia Veterinaria. Vol. 1. Prensa Universitaria pp. 103--131. (1976).

- 10.- JOHNSON H. N. Rabies in viral and rickettsial infectious of man. J. B. Lippincott Co. pp. 814-840. 1965.
- 11.- MAR C., R., G. BIJLENGA y E. HERNANDEZ B., -
Infección abortiva de Rabia. VIII Reunión Anual del --
I.N.I.P. (1971)
- 12.- SEDWICK W.D. y T.J. WIKTOR, Detection of ra---
bies virus LCV and other RNA viruses in BHK 21/135-
Agarose suspensions J. Virol., 1224-1226. 1967.
- 13.- Vigilancia Epidemiológica, Rabia en un Técnico de -
Laboratorio en Nueva York. Boletín mensual de la ofi-
cina sanitaria Panamericana, Vol. IX, No. 48 Ago. --
P.I. 1977.
- 14.- WIKTOR, T.J. New vaccines and the future of ra--
bies prophylaxis. Proc. int. conf. on appl. vacc. aga-
inst. viral, Rickettsial and Bact. dis. of man. Sci.Publ.
PAHO No. 226. 1971 .
- 15.- WIKTOR, T.J. Personal Newsletter. Feb. 1, p. 1-2.1977.

- 16.- WILSON D.B., E BILLINGHAM R. Lymphocytes and transplanted immunity. *adv. Immunol.* 7, 189-193. 1967.
- 17.- SCRIMINI, C.A., MARQUEZ, A. RIERA, C.A. y -- ZAPATA M. Protección para Rabia en ratones por --- transferencia de Células. Primer Congreso y IV Jornadas Argentinas de Microbiología. Pag. 22. Buenos Aires 1976.