



Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
C U A U T I T L A N



EFFECTO DEL METILFENIDATO SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS DE LA RABIA

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
Que para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P r e s e n t a
JAVIER IBARRA LOPEZ

Asesor: DR. JOSE ALVARO AGUILAR SETIEN

Coasesor: BIOL. LETICIA RAMOS RAMIREZ



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 está 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, no permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de tesis: Efecto del Metilfenidato sobre la replicación del virus de la rabia.

que presenta el pasante: Javier Ibarra López
 con número de cuenta: 8958819 - 4 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 17 de abril de 1995

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>
VOCAL	<u>Dr. José Alvaro Aguilar Setién</u>
SECRETARIO	<u>Q.B.P. Judith Martínez Zamitz</u>
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Susana E. Mendoza Elvira</u>
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Victor M. Zendejas Duitrón</u>

DEDICATORIAS:

Esta tesis se la dedico con mucho cariño a:

*A Paloma , porque sé que desde donde quiera que estés
te sentirás orgullosa y feliz por este logro en mi vida profesional
y personal. A tú memoria, nunca te olvidaré*

*A mis padres por el gran apoyo brindado a lo largo de mi carrera, porque
siempre creyeron en mi y me levantaron cuando caí.*

A mis abuelos porque no los defraude, donde quiera que estén.

*A mis amigos Martiña, gracias por tú amistad tan
desinteresada; Iris conluye tu meta, eres una de las personas que
más estimo..*

A los BUFALOS, por los momentos y vivencias pasadas

*A Rosita, Evita, Lucy, Elisa, Hilda, Adriana, Gaby, Judith ; Es muy
agradable contar con su amistad.*

*A todas las personas que siempre tuvieron confianza en que lo lograría, no los
defraudé*

AGRADECIMIENTOS:

Mi más sincero agradecimiento a:

DIOS por haberme concedido la vida y posteriormente la sabiduría y fortaleza suficientes para lograr mi más caro anhelo

Mi Madre por luchar siempre junto conmigo para que pudiera lograr esta meta

La UNAM por darme la oportunidad de terminar una carrera.

La FIESC por formarme como profesionista y a todo su personal docente que contribuyó en la formación de un profesionista, YO.

Al Dr. Alvaro Agullar por la amistad y asesoramiento brindado a lo largo de este trabajo

La Biol. Leticia Ramos por los consejos y ayuda prestada en la parte práctica de este trabajo

La QFB. Yolanda León por todos los consejos brindados y ayuda prestada para la realización de esta tesis. Yolanda, Muchas gracias.

A la maestra Susanita por la confianza brindada

Liss, gracias por tu ayuda tan desinteresada.

YTEL, gracias por el tiempo dedicado, creo que sin tu ayuda, si hubiera podido terminar, pero con un poco de más trabajo. Te estimo demasiado.

**ESTA TESIS SE REALIZO EN LA UNIDAD DE
INVESTIGACION MEDICA EN INMUNOLOGIA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL
SIGLO XXI DEL IMSS.
Y FUE FINANCIADA POR EL CONACYT**

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
I.- INTRODUCCION	1
1.1 Generalidades	1
1.2.- Características y propiedades del virus de la rabia	2
1.2.1.- Características físicas	2
1.2.2.- Propiedades bioquímicas	3
1.3.- Patogenia	4
1.4.- Manifestaciones clínicas	5
1.5.- Diagnóstico	6
1.6.- Prevención	7
1.7.- Características del Metilfenidato	9
1.7.1.- Propiedades fisicoquímicas	9
1.7.2.- Farmacodinamia	9
1.7.3.- Farmacocinética	9
1.8.- Justificación de la investigación	11
II.- OBJETIVOS	12
III.- MATERIAL Y METODOS	13
3.1.- Virus	13
3.2.- Células	13
3.3.- Animales	13
3.4.- Experimentos "in vitro"	13
3.4.1.- Titulación del virus de la rabia cepa Pasteur cultivado en células BHK 21 a diferentes concentraciones de Metilfenidato.	13

3.5.- Experimentos "in vivo"	14
3.5.1.- Titulación del sobrenadante del virus de la rabia cepa Pasteur a diferentes concentraciones de Metilfenidato inoculados por vía intracerebral en ratones.	14
3.5.2.- Titulación del virus de la rabia cepa Pasteur en ratones por inoculación intracerebral en presencia y ausencia de almidón y/o Metilfenidato	15
3.5.3.- Influencia del Metilfenidato en el desafío intraplantar en ratones adultos con el virus de la rabia cepa de referencia CVS 11.	15
3.5.4.- Pruebas de antigenicidad del virus de la rabia cepa atenuada Acatlán V319, en presencia y en ausencia de Metilfenidato, utilizando almidón como adyuvante.	16
IV.- RESULTADOS	19
4.1.- Experimentos "in vitro"	19
4.2.- Experimentos "in vivo"	21
4.2.1.- Titulación del virus de la rabia cepa Pasteur en ratones BALB/C inoculados por vía intracerebral.	21
4.2.2.- Titulación del virus cepa Pasteur en ratones por inoculación por vía intracerebral en presencia y ausencia de Metilfenidato.	23
4.2.3 - Influencia del Metilfenidato en la mortalidad de ratones al desafiarlos con el virus de referencia cepa - CVS 11.	24

4.2.4.-Antigenicidad de la cepa atenuada Acatlán V319 en presencia y en ausencia de Metilfenidato utilizando almidón como adyuvante.	31
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

V.- DISCUSION	42
----------------------	-----------

VI.- CONCLUSIONES	48
--------------------------	-----------

VII.- BIBLIOGRAFIA	49
---------------------------	-----------

I.- INTRODUCCION

1.1.- Generalidades:

La rabia es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, sólo aquellos países con límites naturales tales como Australia, Inglaterra, Islandia y algunas otras islas han podido mantenerse libres de esta enfermedad.^[10,17,42]

El virus de la rabia es único por su capacidad para infectar a todos los mamíferos, los cuales en su forma salvaje constituyen un amplio reservorio de la enfermedad, formando así un peligro constante para el hombre y animales domésticos.^[17,20]

La rabia es una infección viral común al hombre y a un gran número de especies animales, en las cuales el virus y las lesiones que provoca se desarrollan sobre todo, a nivel sistema nervioso central.^[30,40,42]

Los animales susceptibles a la rabia pertenecen a todas las especies de sangre caliente y muestra una sensibilidad bastante variada a la infección, pudiéndose diferenciar los muy sensibles, como los carnívoros de la fauna silvestre, gatos y bovinos; los medianamente sensibles como es el caso del perro, el caballo y primates así como los poco sensibles como el caso del hombre.^[22]

La enfermedad y su carácter contagioso, así como el peligro de la mordedura de perros hidrófobos eran conocidos desde los tiempos de Aristóteles y Demócrito. Celsus, describe por vez primera una relación entre la rabia en el hombre y los animales con esta enfermedad.^[39,44]

Pasteur, en 1884, fue el primero en modificar la patogenicidad del virus, haciendo una serie de pases intracerebrales, y realiza en 1889 la

primera vacunación con virus atenuado, extraído de médula desecada. En 1903 Negri descubre los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en células nerviosas de humano y de animales infectados con el virus de la rabia.^[21]

En 1930 Huyt y Jungeblis fueron los primeros en aislar al virus de la rabia en ratones albinos. En 1960, Kaplan y colaboradores demostraron la presencia del antígeno rábico en células de riñón de hamster, mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes.^[20,28]

1.2.- Características y propiedades del virus de la rabia.

1.2.1.- Propiedades físicas.

El virus de la rabia pertenece a la familia **Rhabdoviridae** y al genero **Lyssavirus**.^[12,18]

En observaciones al microscopio electrónico, el virus tiene forma de bala, es un virus envuelto cuya superficie esta cubierta de proyecciones llamadas peplómeros, mide 180 nm de longitud y de 75 a 80 nm de ancho, tiene la propiedad de aglutinar eritrocitos de ganso.^[10,32,35]

Es sensible a los solventes no polares, al jabón, a las temperaturas de pasteurización, a la luz ultravioleta, al etanol en una proporción de 45-70%, también a los compuestos de amonio cuaternario y derivados del yodo.^[23]

El ácido nucleico se inactiva fácilmente por β -propiolactona, resisten la desecación, es estable en un intervalo de pH de 3-11.^[28]

1.2.2.- Propiedades bioquímicas.

El virus de la rabia está constituido por un complejo antigénico de diferentes estructuras proteicas, tal como la proteína M, que es de característica no glucosilada, tiene un peso molecular (PM) de 25.3 Kdalton y otra proteína glucosada denominada glicoproteína (Proteína G) con un PM de 67 Kdalton, siendo la más importante de todas. Esta proteína sobresale de la superficie externa de la envoltura viral formando las proyecciones o espículas del virión. La importancia de esta proteína, radica en que es la responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes y de la respuesta inmune celular, la cual confiere inmunidad en un desafío contra el virus y es requerida para la presentación del antígeno al sistema inmune. Además es responsable de la adherencia del virión a las células blanco y actúa como hemaglutinina con los eritrocitos de ganso.^(9,14)

La nucleocápside está constituida por una molécula de ácido ribonucleico (ARN), una proteína N con un PM de 55.5 Kdalton y una ARNpolimerasa formada por dos polipéptidos, uno de alto PM (L) con un PM de 185 Kdalton y otro más pequeño (no estructural) de 37.5 Kdalton. La molécula de ARN es de cadena sencilla y polaridad negativa y tiene un PM de 3.5 a 4.5 millones de Dalton.^(16,34)

La replicación del virus de la rabia es similar a la de otros virus con RNA de una sola cadena de sentido negativo. El RNA del virión es transcrito a RNA mensajero (RNAm) monocistrónico por la transcriptasa del virus. Estos RNAm son los encargados de formar las proteínas virales.^(32,38)

"In vivo" la replicación del virus de la rabia está restringida al tejido nervioso del huésped y su neurotropismo es la principal característica de esta enfermedad. "In vitro", presenta una amplia variedad de células huésped, que comprenden casi todas las células de mamíferos

y aves, tanto provenientes de cultivos primarios como de las líneas celulares derivados de éstos.⁽⁴⁸⁾

La primera etapa del ciclo de replicación viral ocurre con el reconocimiento del virus por los receptores celulares que se encuentran en la superficie de la membrana plasmática. La unión del virión se lleva a cabo por una atracción electrostática entre las cargas de las proteínas superficiales del virus y las cargas complementarias del receptor celular específico.^(15,48,51)

1.3.- Patogenia.

Las vías de entrada en el huésped afectado, son principalmente por mordida de un animal rabioso, aunque en ocasiones puede atravesar membranas de la mucosa respiratoria y digestivo, pero nunca pasa a través de piel intacta. La transmisión aérea (aerosoles) no es un mecanismo muy común, aunque es posible en circunstancias excepcionales, como es en lugares donde exista una alta concentración de virus, tal es el caso de las cuevas donde habitan los murciélagos y en laboratorios donde se trabajan con fluidos que contienen el virus de la rabia.⁽⁹⁾

El virus tarda 15 minutos en penetrar en las células de los sistemas de cultivo tisular, después, ya no es posible neutralizar con el anticuerpo específico.^(9,43)

En el organismo, el virus se difunde en sentido centripeto, sobre todo hacia el sistema nervioso, pero también puede llegar a hacerlo por vía hemática cuando se inyectan grandes cantidades del virus. Este se multiplica en el músculo o tejido conjuntivo y se propaga a través del endoneurio de las células de Schwann, hasta el sistema nervioso central

(SNC) en sentido centripeto, a una velocidad de 3mm. por día. Al llegar a cerebro avanza a las glándulas salivales por la inervación, continuando por todos los nervios periféricos.^(20,27)

El período de incubación se define como el tiempo que transcurre desde la penetración del virus de la rabia en un organismo vivo, hasta la aparición de los primeros signos de la enfermedad. Este es muy variable, depende de la cantidad de virus que se inoculara, de la cepa y del lugar en que se produzca la vía de entrada.^(26,45)

En el hombre, el período de incubación es de 3 meses, en el perro es de 3 a 8 semanas, en el gato y bovinos es de 2 a 4 semanas.^(26,45)

1.4.- Manifestaciones clínicas.

Clinicamente se reportan dos formas de presentación de la enfermedad: la furiosa y la muda. La rabia furiosa se refiere a los animales que presentan una fase de excitación predominante y la rabia muda es aquella donde la fase excitativa es extremadamente corta o ausente y la enfermedad progresa rápidamente a fase parálitica. En perros el curso clínico de la enfermedad se puede dividir en tres fases.⁽³⁴⁾

1.-La fase prodrómica, que usualmente dura de dos a tres días, el animal muestra cambios en la conducta. Durante esta fase puede haber fiebre ligera, dilatación de pupilas y disminución ligera del reflejo corneal.⁽³⁴⁾

2.-La fase excitativa usualmente dura de uno a siete días, es más fácilmente reconocible por sus signos agresivos típicos, sin embargo, en ocasiones llega a ser tan corta que no se observa. El perro rabioso en

esta etapa, se encuentra irritable, nervioso e inquieto; responde exageradamente a los estímulos visuales y sonoros, observándose: excitabilidad, fotofobia e hiperestesia. Puede haber alotrofagia y tendencia a morder objetos fijos y móviles: En la mayoría de los casos hay dificultad para deglutir y cambios en el ladrido, debido a la parálisis de los músculos laríngeos y de la deglución, causando sialorrea. (25,33)

3.-En los estados finales, se presentan convulsiones e incoordinación muscular, así como una mirada fija, distante y ausente. Si el animal no muere durante uno de los ataques convulsivos, entra a la fase paralítica, durante la cual la enfermedad progresa de una incoordinación muscular y una parálisis de todo el cuerpo, seguida de coma y muerte. (25,33)

El curso clínico de la enfermedad en general, incluyendo la fase prodrómica tiene una duración de hasta diez días, sin embargo las manifestaciones clínicas dependen en gran medida del tipo de cepa viral utilizada y de la especie del animal inoculado. (36,45)

1.5.- Diagnóstico.

Debido a que los síntomas de la rabia son similares a los de otras encefalitis, es necesario realizar el diagnóstico mediante una técnica de laboratorio que ofrezca condiciones óptimas en cuanto a la sensibilidad, precisión y rapidez.(2)

Dentro de las técnicas más empleadas, es el examen histopatológico mediante la tinción de Seller. En la actualidad la prueba más usual para el diagnóstico de la rabia, es la técnica de anticuerpos

con fluorocromo y dirigidos contra el antígeno (el virus de la rabia) presente en un corte histológico, se dejan reaccionar y posteriormente se observa en el microscopio de luz ultravioleta, la fluorescencia, nos indica la presencia del antígeno.^(2,29)

Actualmente, se encuentra en el mercado, un sistema inmunoenzimático para la detección del antígeno en muestras de cerebro. El anticuerpo que se utiliza está dirigido contra la nucleocápside del virus de la rabia.⁽⁴⁾

Pero definitivamente la inoculación intracerebral al ratón lactante (por su gran susceptibilidad) seguida de la prueba de anticuerpos fluorescentes en improntas de tejido cerebral, sigue siendo una de las pruebas más empleadas para el diagnóstico de la rabia en el laboratorio. Sin embargo, la inoculación a ratones lactantes solo se realizará en caso de que la prueba de inmunofluorescencia sea negativa.⁽⁴⁾

1.6.- Prevención.

Actualmente existen vacunas inactivadas y de virus activo modificado, elaborado tanto en animales como en cultivos celulares.

Las vacunas más comunes son la tipo Fuenzalida, elaborada en cerebro de ratón lactante que contiene al virus inactivado con luz ultravioleta, y las vacunas de virus activo modificado, elaboradas en cultivos celulares con la cepa Era, Roxane y Acatlán V319. Por otro lado, también se preparan vacunas en células diploides como es la línea celular VERO. Con las vacunas de tejido tisular, se trata de conseguir un producto más inmunogénico e inocuo, es decir que las reacciones adversas que produce sean mínimas.^(6,7)

Las primeras vacunas fueron preparadas con cepas patógenas atenuadas por sucesivos pases en cerebros de animales. Estas fueron luego reemplazadas por vacunas inactivadas para evitar el riesgo relacionado con la posible presencia de trazas residuales de virus patógeno. Para la inmunización en animales, se utilizan cepas atenuadas.^[6,7]

Las vacunas inactivadas preparadas en cerebros de animales adultos son utilizada en algunos países en vías de desarrollo, tienen una respuesta inmunológica débil, lo que implica un gran número de dosis. Además presentan un alto grado de toxicidad. Por la presencia de elementos neuroparalíticos como la mielina, que proviene del tejido nervioso de los animales en los que se cultiva el virus. ^[6,7,30]

Posteriormente, se utilizaron ratones lactantes, para eliminar el elemento neuroparalítico, este tipo de vacunas redujo a un caso de complicaciones entre diez mil, pero su inmunogenicidad sigue siendo muy baja.^[30]

Actualmente se ha dado un gran paso en la producción de vacunas, con el desarrollo de cultivos celulares "in vitro", con lo cual se pueden obtener vacunas extremadamente puras y muy inmunogénicas, el riesgo de complicaciones neurológicas desapareció completamente y fue posible administrar la vacuna como medida preventiva antes de la exposición en humanos.^[30,46]

Para los profesionales dedicados al manejo del virus es recomendable el uso de vacunas como medio de prevención, en estos casos se utiliza la vacuna elaborada en células VERO, ya cuando la vacunación es postexposición se utilizan las vacunas inactivadas tipo fuenzalida o así como vacunas de virus cultivadas en células diploides.^[7,8,46]

En animales se utilizan como medida de prevención vacunas con cepas atenuadas, tales como Acatlán, Roxane y Era.⁽³⁰⁾

1.7.- Características del Metilfenidato

1.7.1.- Propiedades fisicoquímicas.

El clorhidrato de Metilfenidato es la sal del Metilfenidato y tiene las siguientes propiedades: un punto de fusión de 224-226 °C, un pKa= 8.9, es soluble en agua, alcohol y cloroformo.⁽³⁷⁾

1.7.2.- Farmacodinamia.

El Metilfenidato es ampliamente utilizado como fármaco de elección para el tratamiento de niños con hiperactividad y disfunción en el aprendizaje, también se emplea como terapia en casos de narcolepsia grave. Lleva a cabo su función psicotrópica mediante un mecanismo catecolaminérgico.⁽²⁴⁾

Estudios bioquímicos han demostrado que el Metilfenidato es parecido a las d-anfetaminas en cuanto a su mecanismo de acción. Eleva niveles de dopamina y noradrenalina, ambas drogas pueden inhibir la acción de la Monoaminooxidasa.⁽²⁴⁾

1.7.3.- Farmacocinética.

La sustancia activa, al clorhidrato de Metilfenidato, se absorbe rápida y casi completamente. La ingestión junto con alimentos acelera la absorción, pero no influye sobre la cantidad absorbida.⁽¹⁴⁾

Los picos de concentración plasmática (11 ng/ml), se alcanzan en promedio a las dos horas de haber administrado 0.30mg./kg. En la sangre el Metilfenidato y sus metabolitos se distribuyen en el plasma (57%) y hematíes (43%).⁽⁴⁾

El Metilfenidato se elimina del plasma con una vida media de dos horas. El 78-79% de la dosis administrada se excreta en la orina y del 1-3% en heces en forma de metabolitos en el curso de 48-96 horas. La mayor parte de la dosis se excreta con la orina en forma de ácido-2-fenil-2-piperidilacético (ácido ritalínico).^(13,47)

1.8.- Justificación de la investigación

En el primer semestre de 1991, Lockhart y Cols. reportaron que un anestésico disociativo, la Ketamina era capaz de reducir la infectividad del virus de la rabia, sin embargo, a la fecha a pesar de su eficacia a nivel experimental, el mecanismo de acción de la ketamina no ha podido explicarse, aunque si se describe su alta especificidad en cuanto a la replicación del virus de la rabia.

Por otro lado, dados esos resultados que se encontraron al utilizar ketamina, nos dio las bases para probar el efecto de un estimulante del sistema nervioso central, como lo es el Metilfenidato tomando en cuenta que tanto la inhibición como la exaltación de la replicación tienen primordial importancia en el control de la enfermedad. En el primer caso la inhibición tiene un gran valor potencial en cuanto al tratamiento de la enfermedad. En el segundo caso, la exaltación de la replicación tiene un gran valor utilitario en el campo de la producción de vacunas y antígenos virales.

II- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general.

Sabiendo que el Metilfenidato es un estimulante de Sistema Nervioso Central. (SNC) que tiene receptores a nivel neuronal y los receptores del virus de la rabia están al mismo nivel, se evaluará el efecto de este fármaco sobre la replicación del virus de la rabia, tanto "In vivo" como "In vitro"

2.2- Objetivos particulares.

1. Titular al virus de la rabia en presencia y en ausencia de Metilfenidato, "In vitro", mediante la técnica de Inhibición de Focos Fluorescentes.
2. Cuantificar la variación del título de infectividad del virus de la rabia "In vivo" en presencia de Metilfenidato, inoculando por vía intracerebral a ratones BALB/C, comparando los resultados con un grupo testigo, sin Metilfenidato.
3. Medir la producción de anticuerpos antirrábicos en ratones BALB/C inoculados con una cepa vacunal atenuada del virus de la rabia (cepa Acatlán V319) en presencia y en ausencia de Metilfenidato, utilizando almidón como adyuvante.

III.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Virus: En el transcurso del presente trabajo, se utilizaron:

3.1.1 La cepa P.V. (Pasteur virus) adaptada para crecer en la línea celular BHK21.

3.1.2. La cepa de referencia de desafío CVS 11.

3.1.3. La cepa vacunal Acaflán V319.

3.2.- Celulas: se utilizó la línea celular de riñón de hamster BHK21 cultivada en medio mínimo esencial de Eagle MEM, Glasgow BHK21 (GIBCO CO.) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 5% de medio triptosa fosfato (TPB), penicilina y estreptomicina. Para el mantenimiento de las células se utilizó el mismo medio descrito precedentemente, pero suplementado con 2% de suero fetal bovino.⁽⁵⁰⁾

3.3.- Animales: En el transcurso del presente trabajo se utilizaron ratones BALB/C recién destetados (21 días) y ratones adultos de 60 días de 25-30 gramos.

3.4- Experimentos "In vitro".

3.4.1.- Titulación del virus de la rabia Cepa Pasteur (PV) cultivado en células BHK 21 a diferentes concentraciones de Metilfenidato.

La titulación del virus PV adaptado para crecer en la línea continua BHK21, en ausencia y en presencia de 60 y 120 ug/ml de Metilfenidato se llevó a cabo mediante el conteo de focos fluorescentes.

De 100 a 200 Unidades Formadoras de Focos fluorescentes (UFF) fueron inoculados a monoestratos confluentes de células BHK21, cultivadas en placas de plástico con 24 pozos. Después de un período de incubación de 60 minutos, el inóculo se desechó y se agregó a cada pozo, medio BHK21 de mantenimiento sin Metilfedinato (controles) o con las diferentes concentraciones de Metilfedinato a probar (60 y 120 ug/ml) por separado. Transcurridas 72 horas, los monoestratos fueron fijados con acetona al 80% y teñidos con un conjugado fluorescente contra el virus de la rabia. El número de focos fluorescentes obtenidos fueron contados en un microscopio invertido de luz ultravioleta, Olympus Modelo T041.⁽⁴¹⁾

El sobrenadante de los pozos controles y de los que contenían las diferentes concentraciones de Metilfedinato fueron conservados a -70 °C para su posterior titulación mediante inoculación intracerebral (I.C.) en ratones de 21 días.⁽⁵⁾

3.5- Experimentos "In vivo".

3.5.1.- Titulación del sobrenadante del virus de la rabia cepa PV, cultivado en células BHK21 a diferentes concentraciones de Metilfedinato, por inoculación intracerebral en ratones BALB/C.

La titulación de los sobrenadantes del virus PV, cultivados en células BHK 21 se realizó mediante la técnica de Reed y Muench, haciéndose diluciones logarítmicas base diez inoculando estos en ratones BALB/C de 21 días de nacidos por vía intracerebral, el volumen de inoculación fue de 0.03 ml.⁽³¹⁾

3.5.2.- Titulación del virus de la rabia, cepa PV, en ratones BALB/C por inoculación intracerebral, en presencia y en ausencia de almidón y/o Metilfenidato.

En esta titulación se utilizó almidón en una concentración de 10 mg/ml en la suspensión viral y posteriormente se hicieron diluciones logarítmicas base diez. El Metilfenidato se utilizó a una concentración de 5mg/ml en la suspensión viral, de igual forma se hicieron diluciones logarítmicas base diez, se manejó un control de virus (sin almidón y sin Metilfenidato) y se procedió a Inocular por vía intracerebral.

3.5.3.- Influencia del Metilfenidato en el desafío Intraplantar en ratones BALB/C adultos con el virus de la rabia, cepa de referencia CVS 11.

Se formaron cuatro grupos de ratones para probar la influencia del Metilfenidato administrado a diferentes tiempos de la inoculación del virus rábico. Para el grupo A, se hicieron diluciones logarítmicas base diez del virus de referencia, a su vez se prepararon una solución de Metilfenidato con una concentración de 1mg/ml. Primeramente se administró por vía intraplantar 0.03ml de la solución de Metilfenidato, inmediatamente después se inocula el virus por la misma vía; para este grupo se lleva a su vez un grupo control, al que se le administra como control solución salina e inmediatamente después se les inocula el virus de referencia.

En el grupo B, la diferencia con respecto al grupo A es el tiempo de inoculación del virus y la administración del Metilfenidato. En este grupo B, primero se inocula el virus de referencia y 18 horas después se administra el Metilfenidato; de la misma forma se lleva un grupo control, al cual se le inocula el virus, pero se le administra solución salina en

lugar de Metilfenidato, la inoculación del virus y la administración del fármaco es por vía intraplantar.

En cuanto al grupo C, la variación del tiempo entre la inoculación del virus y la administración del Metilfenidato fue de 24 horas.

Así mismo en el grupo D, se trabajó con una sola dilución del virus más el Metilfenidato, formándose una suspensión con ambos, la concentración de Metilfenidato que se utilizó para todos los casos fue de 1 mg/ml, utilizándose un volumen de 0.03ml. de inóculo.

3.5.4.- Pruebas de antigenicidad del virus de la rabia cepa atenuada Acatlán V319, en presencia y en ausencia de Metilfenidato utilizando almidón como adyuvante.

3.5.4.1 Construcción de la curva de referencia para cuantificar anticuerpos antirrábicos.

Para determinar los niveles de anticuerpos antirrábicos en suero de ratones inmunizados con el virus vacunal cepa Acatlán V319 se construyó una curva de referencia; tomando un suero estandarizado que contiene 10 unidades equivalentes por mililitro, una unidad equivalente es igual a una unidad internacional (Ueq/ml.) = (U.I/ml).

La construcción de esta curva se hizo por una técnica inmunoenzimática como es la técnica de ELISA, empleando un equipo comercial de Diagnostic Pasteur "Platelia Rabia" que determina anticuerpos IgG contra la glicoproteína del virus de la rabia. La lectura se realiza a 492 nm.^[3,4]

Por interpolación sobre la curva de los valores de absorbancia obtenidos en los sueros problema se sacó el nivel de anticuerpos para éstos.^(3,4)

Para esta parte del trabajo, se utilizaron ratones BALB/C adultos de 60 días de nacidos, formándose varios grupos de diez ratones cada uno. El Metilfenidato se administró en varias combinaciones a una misma concentración (0.2mg/ml). Al grupo A, se le inoculó una mezcla de virus Acatlán V319 más Metilfenidato y adyuvante (almidón a una concentración de 20mg/ml).

Al grupo B, se le inoculó una mezcla del virus Acatlán V319 más el adyuvante, a la misma concentración que en el caso anterior.

Al grupo C se inoculó el virus Acatlán más el Metilfenidato a una concentración de 0.2mg/ml, así como al grupo D se le inoculó únicamente el virus Acatlán V319, este es el grupo control. El volumen de inoculación es de 0.2 ml por vía intraperitoneal (I.P.).

A los catorce días se tomaron muestras de sangre de los ratones de cada uno de los grupos inoculados para la obtención del suero, a fin de hacer la determinación de anticuerpos antirrábicos.

Para la determinación de los anticuerpos se utilizó el equipo comercial de Diagnostic Pasteur, "Platella Rabia".

Esta es una técnica inmunoenzimática para la detección de los anticuerpos antiglicoproteína del virus rábico, en el suero o en el plasma humano. La prueba se fundamenta en la utilización de una fase sólida, preparada con la glicoproteína extraída de la membrana de virus inactivado y purificado, que al agregar el suero que contiene anticuerpos antirrábicos se unen al antígeno viral y posteriormente se agrega un anticuerpo antigamaglobulina marcado con peroxidasa y

posteriormente se le agrega una solución que contiene o-fenilendiamina (sustrato), si la reacción es positiva se forma el complejo antígeno anticuerpo antigamaglobulina marcada que al agregar OPD (sustrato) nos da una coloración ámbar en caso de que sea positivo, esta prueba se lee a una longitud de onda de 492 nm.^[3,4]

IV.- RESULTADOS

4.1.- Experimentos "In vitro".

La figura No. 1A nos muestra que existe una reducción de focos fluorescentes cuando se le adiciona el Metilfenidato al cultivo celular con el virus; en la figura 1 B, se puede observar que no hay inhibición de focos fluorescentes siendo este es nuestro grupo control (con una $P < 0.004$).



Figura 1A Resultados al cultivar el virus de la rabia cepa Pasteur en células BHK21 en presencia de Metilfenidato, realizados por el método Inhibición de focos fluorescentes ($P < 0.004$).

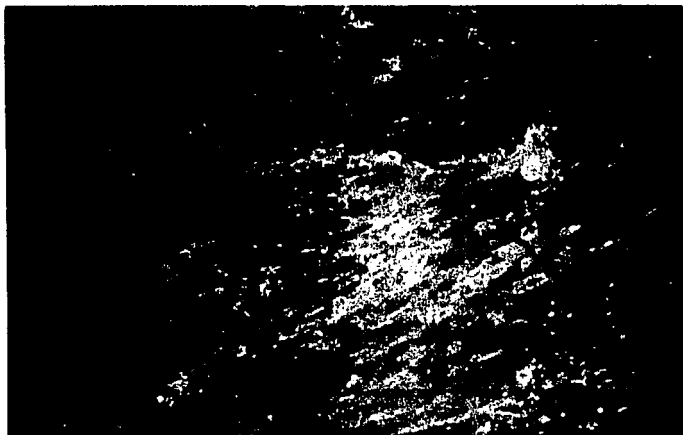


Figura 1B Resultados al cultivar el virus de la rabia cepa Pasteur en células BHK21 en ausencia de Metilfenidato, realizados por la técnica de inhibición de focos fluorescentes ($P < 0.004$).

4.2.- Experimentos "In vivo".

4.2.1.- Titulación del virus de la rabia cepa PV en ratones BALB/C inoculados por vía intracerebral.

En la Tabla No. 1 nos muestra los resultados que se obtuvieron al titular el virus de la rabia a diferentes concentraciones de Metilfenidato, en nuestro grupo control en el cual se titula únicamente al sobrenadante colectado del cultivo celular inoculado con el virus cepa PV, dándonos un título DL 50% de $10^{7.35}$ /ml.

TABLA No. 1 TITULACION DEL SOBRENADANTE DE VIRUS RABICO CEPA PV CULTIVADO EN CELULAS BHK-21, CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METILFENIDATO.

CONCENTRACION DE MF	TITULO DL 50% / ml.
CONTROL	$10^{7.35}$
60 Ug / ml.	10^4
120 Ug / ml.	$10^{3.88}$

La titulación se realizó en ratones BALB/C lactantes por el método de reed y Muench, utilizando veinte ratones por dilución.

Las diluciones trabajadas fueron desde 10^{-1} hasta 10^{-10}

MF: Metilfenidato

PV: Virus de la rabia cepa Pasteur

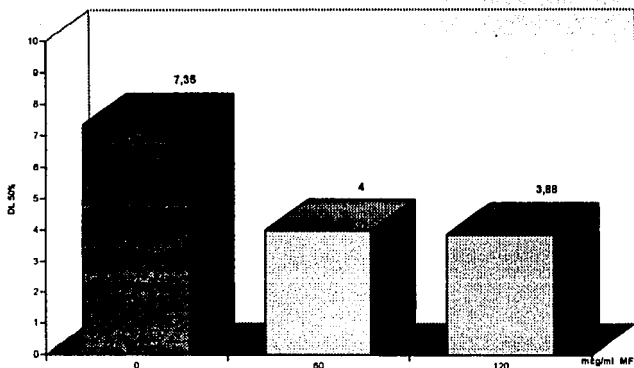
En el sobrenadante colectado del cultivo celular al cual se le agregó Metilfenidato a una concentración de 60 mcg/ml. y su posterior titulación en ratones, obteniéndose una DL 50% de 10^4 .

En un tercer grupo se tituló el sobrenadante obtenido del cultivo celular inoculado con el virus de la rabia cepa PV, en el cual se había

adicionando Metilfenidato a una concentración de 120 mcg/ml. Presentando una DL 50% de $10^{3,88}$ /ml.

Como se puede observar el Metilfenidato afecta la replicación del virus, causando un abatimiento en el título viral como se puede observar en la figura No. 2 ($P < 0.001$).

FIGURA 2 TITULACIÓN DEL SOBRENADANTE DEL VIRUS RABICO CULTIVADO EN CELULAS BHK21 CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MF



Esta titulación se llevo a cabo mediante en método de Reed y Muench empleando diluciones del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , estos resultados tienen una $P < 0.001$

4.2.2.- Titulación del virus cepa PV en ratones BALB/C por inoculación por vía intracerebral en presencia y ausencia de Metilfenidato.

En la Tabla No. 2 observamos los valores obtenidos al hacer una suspensión virus-Metilfenidato, teniendo un grupo control. Para este grupo se obtiene un título con una DL 50% de $10^{9.67}$ en el grupo tratado con Metilfenidato el título obtenido en DL 50% es de $10^{5.39}$. Es de notarse el abatimiento del título obtenido en el grupo tratado con Metilfenidato con respecto al control. En la figura No. 3, podemos apreciar gráficamente estos resultados ($P < 0.001$).

TABLA No. 2 RESULTADO OBTENIDOS EN LA TITULACION DEL VIRUS RABICO CEPA PV EN PRESENCIA DE 5 mg. DE METILFENIDATO

GRUPO	TITULO DL 50% /ml.
CONTROL	$10^{9.67}$
PV + MF	$10^{5.39}$

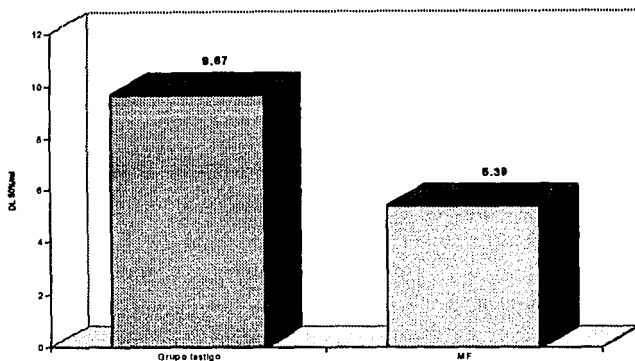
La titulación se realizó en ratones BALB/C lactantes por el método de Reed y Muench, utilizando veinte ratones por dilución.

Las diluciones trabajadas fueron desde 10^{-1} hasta 10^{-10}

MF: Metilfenidato

PV: Virus de la rabia cepa Pasteur

FIGURA 3 TITULACION DEL VIRUS RABICO CEPA PV EN PRESENCIA DE 5 mg DE METILFENIDATO



Esta titulación se llevó a cabo mediante el método de Reed y Muench haciendo diluciones del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-10} los resultados obtenidos están dados en unidades logarítmicas base 10, con una $P < 0.001$.

4.2.3.- Influencia del metilfenidato en la mortalidad de los ratones al desafiarlos por vía intraplantar con el virus de referencia CVS 11.

En la Tabla No. 3, encontramos los valores obtenidos al administrar 0.03 mg. de Metilfenidato por vía intraplantar en ratones BALB/C e inmediato desafío con el virus de referencia CVS 11, en esta parte de la investigación se trabajó con tres diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) llevando en forma paralela un grupo testigo para cada dilución (no se trató con Metilfenidato). De esta forma obtenemos para la dilución 10^{-1} en nuestro grupo testigo un porcentaje de mortalidad del 100% y para el grupo tratado con Metilfenidato la mortalidad observada es del 70%. En la dilución de 10^{-2} para el grupo al cual no se le administró

Metilfenidato, la mortalidad encontrada es del 90% en cambio, en los grupos tratados fue del 60%. Cuando se trabajó la dilución 10^{-3} dentro del grupo testigo la mortalidad producida por el virus fue del 55% a diferencia del grupo tratado en el cual la mortalidad encontrada es del 10%. Estos resultados se observan gráficamente en la figura No. 4.

TABLA No. 3 RESULTADO OBTENIDOS EN POR CIENTO DE MORTALIDAD AL ADMINISTRAR 0.03 mg. DE METILFENIDATO POR VIA INTRAPLANTAR E INMEDIATO DESAFIO CON EL VIRUS DE LA RABIA CEPAS CVS POR LA MISMA VIA DE INOCULACION

GRUPO	DILUCION DEL VIRUS	% DE MORTALIDAD
CONTROL	10^{-1}	100
CVS + MF	10^{-1}	70
CONTROL	10^{-2}	90
CVS + MF	10^{-2}	60
CONTROL	10^{-3}	55.5
CVS + MF	10^{-3}	10

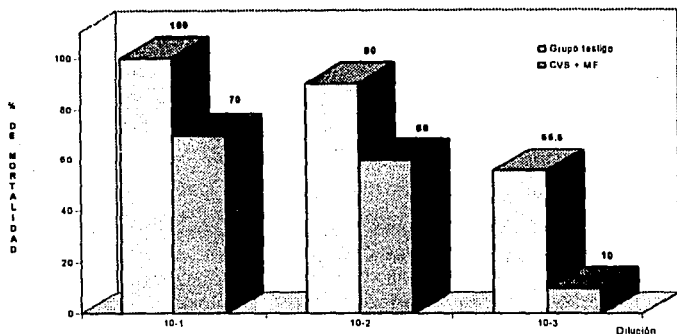
Se trabajaron diferentes diluciones del virus de la rabia cepa CVS, para cada dilucion se utilizó un grupo control o testigo, comparándose el % de mortalidad causado por el virus en presencia y ausencia de metilfenidato.

Se utilizaron veinte ratones BALB/C por grupo

CVS: Cepa normalizada de desafio

MF: Metilfenidato

FIGURA 4 ADMINISTRACION DE METILFENIDATO (0.03 mg/RATON) POR VIA INTRAPLANTAR E INMEDIATO DESAFIO CON EL VIRUS CVS POR LA MISMA VIA



En este experimento se midió la mortalidad causada por el virus del desafío, manejando tres diluciones diferentes se utilizaron 20 ratones por dilución-

En la Tabla No. 4, podemos ver los resultados obtenidos al inocular por vía intraplantar al virus CVS 11 y 18 horas después la administración de Metilfenidato (0.03 mg.) por la misma vía, aquí también se trabajaron tres diluciones como en el caso anterior. En la dilución 10^{-1} se obtuvo una mortalidad para el grupo testigo del 100% y para el grupo tratado con Metilfenidato el porcentaje de mortalidad obtenida fue del 90%; en la dilución de 10^{-2} , se vio una mortalidad del 70% para el grupo control y del 50% para el grupo tratado con Metilfenidato, en la dilución 10^{-3} el porcentaje de la mortalidad en el grupo control es del 50% y el grupo al cual se le administró el fármaco, la mortalidad observada es del 30%, estos resultados se pueden ver gráficamente en la figura No. 5.

TABLA No. 4 RESULTADO OBTENIDOS EN POR CIENTO DE MORTALIDAD AL DESAFIAR CON VIRUS DE LA RABIA CEPA CVS POR VIA INTRAPLANTAR A RATONES BALB/C Y ADMINISTRACION DE 0.03 mg. DE METILFENIDATO 18 HORAS DESPUÉS POR LA MISMA VIA

GRUPO	DILUCION DEL VIRUS	% DE MORTALIDAD
CONTROL	10^{-1}	100
CVS + MF	10^{-1}	90
CONTROL	10^{-2}	70
CVS +MF	10^{-2}	50
CONTROL	10^{-3}	50
CVS + MF	10^{-3}	30

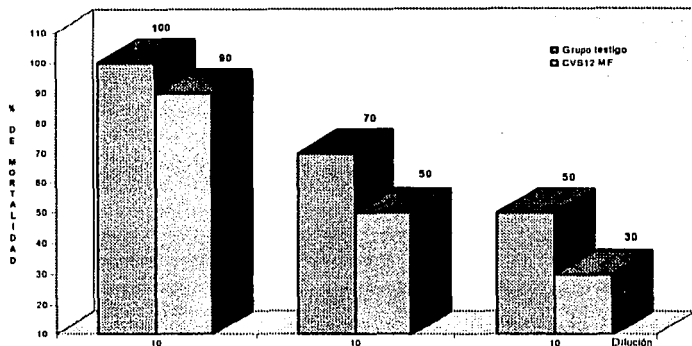
Se trabajaron diferentes diluciones del virus de la rabia cepa CVS, para cada dilución se utilizó un grupo control o testigo, comparándose el % de mortalidad causado por el virus en presencia y ausencia de metilfenidato.

Se utilizaron veinte ratones BALB/C por grupo

CVS: Cepa estandarizada de desafío

MF: Metilfenidato

FIGURA 5 DESAFIO CON EL VIRUS CVS POR VIA INTRAPLANTAR Y ADMINISTRACION DEL METILFENIDATO (0.03 mg/RATON) 18 HORAS DESPUES POR LA MISMA VIA.



En este experimento se midió la mortalidad causada por el virus de desafío manejando tres diluciones diferentes, se utilizaron veinte ratones por grupo.

En la Tabla No. 5 se observan los resultados obtenidos al desafiar con el virus de la rabia cepa CVS 11 por vía intraplantar a ratones BALB/C, y la administración del Metilfenidato 24 horas después. Aquí se trabajó con una dilución fija (10^{-2}) llevando un grupo testigo. La mortalidad encontrada para el grupo testigo es del 85% y para el grupo tratado con Metilfenidato es del 80%. La figura No. 6 observamos gráficamente estos resultados.

TABLA No.5 RESULTADO OBTENIDOS EN POR CIENTO DE MORTALIDAD AL DESAFIAR CON VIRUS DE LA RABIA CEPAS CVS POR VIA INTRAPLANTAR A RATONES BALB/C Y ADMINISTRACION DE 0.03 mg. DE METILFENIDATO 24 HORAS DESPUÉS POR LA MISMA VIA

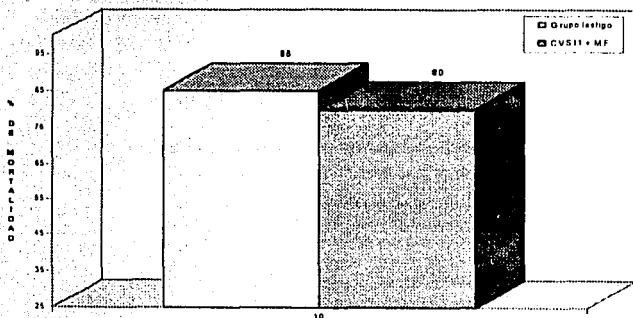
GRUPO	% DE MORTALIDAD
CONTROL	85
CVS + MF	80

Se trabajó con una dilución fija del virus de la rabia (10^{-2}) utilizando veinte ratones por grupo.

CVS: Cepa estandarizada de desafío

MF: Metilfenidato

FIGURA No. 6 DESAFIO CON CVS 11 POR VIA INTRAPLANTAR Y ADMINISTRACION DE METILFENIDATO (0.03 mg/RATON) 24 HORAS DESPUES POR LA MISMA VIA



En este experimento se midió la mortalidad causada por el virus de desafío manejando únicamente una dilución. Se utilizaron veinte ratones por grupo.

En la Tabla No. 6 vemos los resultados obtenidos al inocular el virus cepa CVS 11 por vía intraplantar a ratones BALB/C con administración simultánea del Metilfenidato por la misma vía, se hizo una suspensión virus-fármaco, y el volumen de inoculación fue 0.03 ml, al igual que en el experimento anterior, se trabajó con una dilución fija (10^{-2}). El porcentaje de mortalidad para el grupo control fue de 26.08% y para el grupo tratado con Metilfenidato fue de 8.69%. Estos resultados se observan gráficamente en la figura No. 7.

TABLA No.6 RESULTADO OBTENIDOS EN POR CIENTO DE MORTALIDAD AL DESAFIAR CON VIRUS DE LA RABIA CEPA CVS POR VIA INTRAPLANTAR A RATONES BALB/C Y ADMINISTRACION DE 0.03 mg. DE METILFENIDATO EN FORMA SIMULTÁNEA

GRUPO	% DE MORTALIDAD
CONTROL	26.08
CVS + MF	8.69

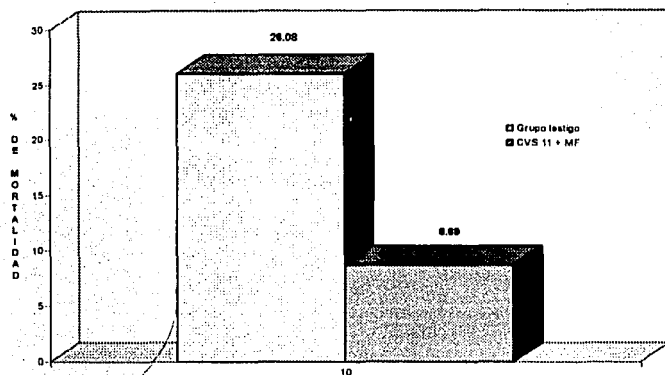
Se trabajó con una dilución fija del virus de la rabia (10^{-2}) se suspendió en el mismo medio del virus en Metilfenidato.

Utilizando veinte ratones por grupo.

CVS: Cepa estandarizada de desafío

MF: Metilfenidato

FIGURA No. 7 DESAFIO CON CVS 11 Y ADMINISTRANDOSE METILFENIDATO (0.03 mg/RATON) EN FORMA SIMULTANEA POR VIA INTRAPLANTAR



En este experimento se midió la mortalidad causada por el virus de desafío manejando únicamente una dilución, se utilizaron veinte ratones por grupo.

4.2.4.- Antigenicidad de la cepa Acatlán V319, en presencia y en ausencia de Metilfenidato, utilizando almidón como adyuvante.

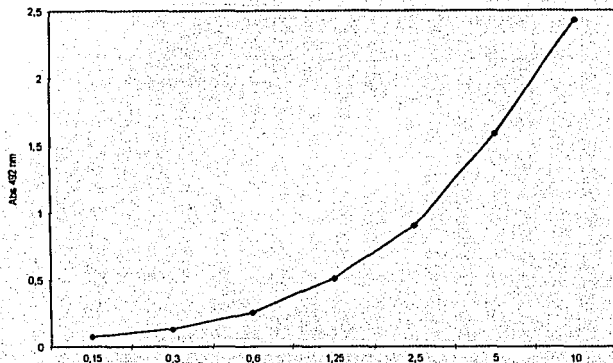
En la tabla No.7 nos muestra los valores obtenidos trabajar un suero de referencia con 10 U:eg/ml, que se empleó para construir la curva de referencia, y poder titular los sueros problemas, por interpolación de las absorbancias obtenidas en los sueros problemas.

TABLA No.7: VALORES DE LA CURVA DE REFERENCIA PARA LA TITULACION DE ANTICUERPOS ANTIRABICOS EN RATONES BALB/C INMUNIZADOS CON LA CEPA ATENUADA ACATLAN V319.

UNIDADES EQUIVALENTES/ml.	ABS (492 nm:)
0.15	0.072
0.30	0.133
0.60	0.256
1.25	0.512
2.5	0.896
5.0	1.587
10	2.432

Para construir la curva de referencia se utilizó un suero estandarizado con 10 ueq/ml de anticuerpos antirábicos, esto se realizó mediante el método de ELISA, utilizando un equipo comercial de Diagnostic Pasteur "Platelia Rabia". La absorbancia se lee a una longitud de onda de 492 nm.

FIGURA No. 8 CURVA DE REFERENCIA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIGLICOPROTEINA DEL VIRUS DE LA RABIA CEPA ACATLAN V319, UTILIZADO PARA LA INMUNIZACION DE LOS RATONES.



Se tomó un suero estandarizado con 10 Ueq/ml, la construcción de la curva de referencia se realizó por medio de la técnica de ELISA, empleando un equipo de marca comercial Diagnostic Pasteur "Platella Rabia". La lectura de las absorbancias se hizo a una longitud de onda de 492 nm.

La Tabla No. 8 nos muestra los resultados obtenidos en Ueq/ml. al titular los sueros de ratones BALB/C vacunados con la cepa atenuada Acatlán V319, se trabajaron tres grupos. El grupo control tiene una media de 8.36 y una desviación estándar de 1.26. El grupo en el cual se utilizó almidón como adyuvante, nos da una media de 9.9 y una desviación estándar de 1.21. Para el grupo en el cual se empleó almidón y el Melilfenidato en forma simultánea se obtuvo una media de 9.85 y una desviación estándar de 0.42 como se puede observar, el título más alto se encuentra en el grupo en el cual se utilizó almidón

como adyuvante, en la figura número 9 se pueden observar estos resultados gráficamente.

TABLA No.8 MEDIA Y DESVIACION ESTANDAR DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN Ueq/ml. DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS VACUNAL ATENUADO DE LA RABIA Y METILFENIDATO Y/O ALMIDON COMO ADYUVANTE

GRUPO	\bar{X}	DESV. ESTANDAR
CONTROL	8.36	1.26
VIRUS + ALM	9.9	1.21
VIRUS + ALM + MF	9.85	0.42

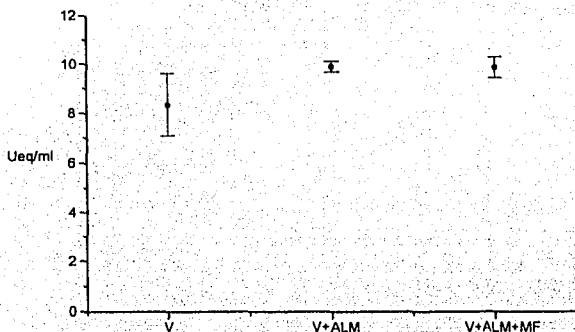
Estos resultados se obtuvieron mediante la técnica de ELISA equipo comercial "Platelia Rabia" para cada grupo se utilizó un mínimo de veinte ratones BALB/C

VIRUS: Cepa Vacunal Atenuada Acallán V319

ALM: Almidón

MF: Metilfenidato.

FIGURA No. 9 UNIDADES EQUIVALENTES /ml DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CONTRA LA RABIA CON EL VIRUS ACATLAN V319 MAS METILFENIDATO Y/O ALMIDON COMO ADYUVANTE.



En esta gráfica se pueden observar las medias y desviaciones estándar de los diferentes grupos trabajados en esta serie. Se utilizaron veinte ratones por grupo. Estos resultados tienen una $P < 0.1$.

Virus: Cepa Vacunal Atenuada Acatlán V319

Alm. Almidón

MF: Metilfenidato.

En la tabla No. 9 se observa el título de anticuerpos antirrábicos obtenidos al inocular con el virus atenuado cepa Acatlán V 319 en los diferentes grupos trabajados: al grupo al cual se le inoculó el virus y se utilizó almidón como adyuvante, en este caso se obtuvo un título de anticuerpos con una media igual a 9.58 y una desviación estándar de 0.64 a un segundo grupo al que se inoculó el virus y se le administró la suspensión de almidón con Metilfenidato y se obtuvo un título de

anticuerpos con una media de 9.21 y una desviación estándar de 0.59; a un tercer grupo que se trató con Metilfenidato y el virus se obtuvo un título con una media de 6.35 y una desviación estándar de 1.25. Como podemos observar el título más alto corresponde al grupo al cual se le inoculó el virus y almidón (utilizado como adyuvante), y el título más bajo se obtuvo en el grupo al cual se le inoculó el virus Metilfenidato. De aquí podemos inducir que el Metilfenidato actúa sobre la replicación del virus afectándolo en alguna etapa de su replicación, en la figura número 10 se observan gráficamente estos resultados.

TABLA No.9 MEDIA Y DESVIACION ESTANDAR DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN Ueq/ml. DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS VACUNAL ATENUADO DE LA RABIA Y METILFENIDATO Y/O ALMIDON COMO ADYUVANTE

GRUPO	\bar{X}	DES. ESTANDAR
VIRUS + ALM	9.58	0.64
VIRUS + ALM + MF	9.21	0.59
VIRUS + MF	6.35	1.25

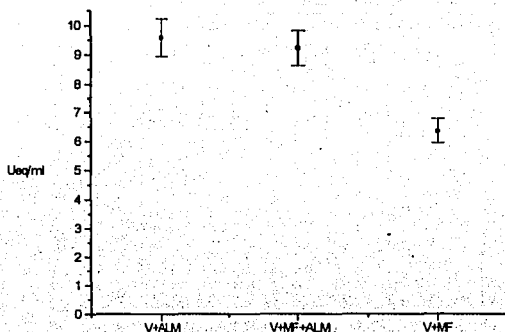
Estos resultados se obtuvieron mediante la técnica de ELISA equipo comercial "Platelia Rabia" para cada grupo se utilizó un mínimo de veinte ratones BALB/C

VIRUS: Cepa Vacunal Atenuada Acatlán V319

ALM: Almidón

MF: Metilfenidato.

FIGURA No. 10 UNIDADES EQUIVALENTES /ml DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CONTRA LA RABIA CON EL VIRUS ACATLAN V319 MAS METILFENIDATO Y/O ALMIDON COMO ADYUVANTE.



Esta gráfica nos muestra las medias y desviaciones estándar de los grupos trabajados en esta serie; se experimentó con cuatro grupos, utilizando un mínimo de veinte ratones por grupo. Estos resultados tienen una $P < 0.1$.

Alm: Almidón

MF: Metilfenidato.

Virus: Ceba Vacunal Atenuada Acatlán V319

En la Tabla No. 10 se trabajó con otra serie de grupos denominándose a uno de estos como testigo (control), a éste se le inoculó únicamente el virus y se obtuvo al titular el suero una media de 4.26 y una desviación estándar de 0.67; a otro grupo se le inoculó el virus y se utilizó almidón como adyuvante y el título presenta una media de 7.15 y una desviación estándar de 1.27; a un tercer grupo se le inocula el virus, almidón y Metilfenidato, la media obtenida es de 7.26 y su desviación estándar de 0.67; a un cuarto grupo se le inoculó virus y Metilfenidato,

dando una media de 2.32 y una desviación estándar de 1.84. Todos estos resultados son en unidades equivalentes por mililitro de suero, en la figura número 11 se observa gráficamente estos resultados.

TABLA No.10 MEDIA Y DESVIACION ESTANDAR DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN Ueq/ml. DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS VACUNAL ATENUADO DE LA RABIA Y METILFENIDATO Y/O ALMIDON COMO ADYUVANTE

GRUPO	\bar{X}	DESV. ESTANDAR
CONTROL	4.26	0.67
VIRUS + ALM	7.15	1.27
VIRUS + ALM + MF	7.26	0.67
VIRUS + MF	2.32	1.84

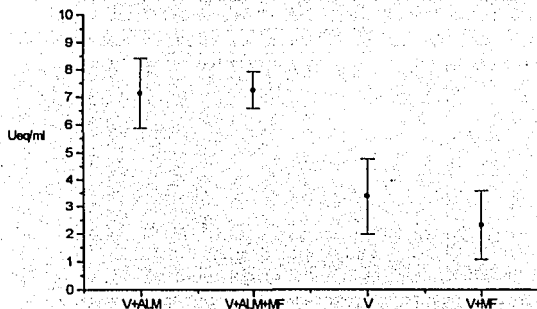
Estos resultados se obtuvieron mediante la técnica de ELISA se utilizó un equipo comercial de Diagnostic Pasteur "Platelia Rabia" para cada grupo se utilizó un mínimo de veinte ratones BALB/C

VIRUS: Cepa Vacunal Atenuada Acatlán V319

ALM: Almidón

MF: Metilfenidato.

FIGURA No. 11 UNIDADES EQUIVALENTES /ml DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CONTRA LA RABIA CON EL VIRUS ACATLAN V319 MAS METILFENIDATO Y/O ALMIDON COMO ADYUVANTE.



Esta gráfica nos muestra las medias y desviaciones estándar de los grupos trabajados en esta serie. Se emplearon cuatro grupos con un mínimo de veinte ratones por grupo, estos resultados tienen una $P < 0.1$.

En la tabla número 11 se muestran los resultados obtenidos en unidades equivalentes de anticuerpos antirrábicos por mililitro; a diferencia de los experimentos anteriores en esta parte de la investigación se utilizó un grupo al cual el virus se le inoculó por vía intraperitoneal y el Metilfenidato se le administró por vía intramuscular, siendo el objetivo de este experimento el observar el efecto sistémico del fármaco sobre el virus cuando este se inocula por vía diferente.

TABLA No.11 MEDIA Y DESVIACION ESTANDAR DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN Ueq/ml. DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS VACUNAL ATENUADO DE LA RABIA Y METILFENIDATO Y/O ALMIDON COMO ADYUVANTE,EMPEANDO DOS VIAS DE ADMINISTRACION PARA EL FARMACO.

GRUPO	\bar{X}	DESV. ESTANDAR
CONTROL	4.83	1.53
VIRUS + MF	2.63	1.28
VIRUS (IP) + MF (IM)	4.5	1.89

Estos resultados se obtuvieron mediante la técnica de ELISA equipo comercial "Platelia Rabia" para cada grupo se utilizó un mínimo de veinte ratones BALB/C.

En este experimento se utilizó una vía de administración del Metilfenidato (I.M.) diferente a la de Inoculación del virus (I.P.), esto fue con el objetivo de probar el efecto sistémico del fármaco sobre el virus.

VIRUS: Cepa Vacunal Atenuada Acatlán V319

ALM: Almidón

MF: Metilfenidato.

IP: Intraperitoneal

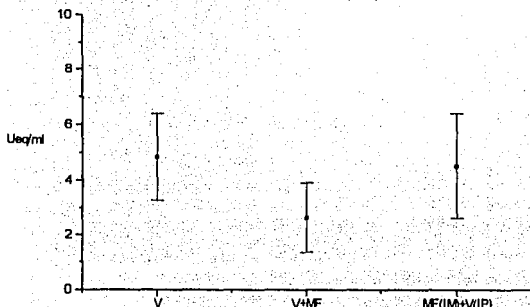
IM: Intramuscular

Encontrando que en el grupo testigo, el título de anticuerpos antirrábicos en unidades equivalentes por mililitro nos da una media de 4.83 y una desviación estándar de 1.53. A un segundo grupo se le inoculó el virus y el Metilfenidato, obteniendo un título con una media de 2.63 y una desviación estándar de 1.28. Un tercer grupo, se le inoculó el virus por vía intraperitoneal y el Metilfenidato se le administró por vía intramuscular, el título que se determinó da una media de 4.5 y una desviación estándar de 1.89.

Como se puede observar, el título más alto corresponde al grupo testigo y no hay una diferencia estadística con el grupo al cual se le

administró el Metilfenidato por vía intramuscular. El título más bajo se obtuvo en el grupo al cual se le inoculó el virus y el Metilfenidato por la misma vía (I.P.), los resultados anteriormente descritos se pueden observar gráficamente en la figura número 12.

FIGURA No.12 UNIDADES EQUIVALENTES POR MILILITRO DE SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CON EL VIRUS ACATLAN V319 MAS METILFENIDATO ADMINISTRADO POR VIA INTRAPERITONEAL POR VIA INTRAMUSCULAR



Esta gráfica nos muestra las medias y desviaciones estándar de los grupos trabajados, para esta serie se emplearon tres grupos y se les administró el metilfenidato por dos vías diferentes. Estos resultados tienen una $P < 0.1$.

V.- DISCUSION

Siempre ha sido de gran importancia el conocer más acerca del comportamiento de los diferentes microorganismos y virus patógenos que afectan al hombre. En este caso, se estudió el comportamiento del virus de la rabia frente al Metilfenidato, que es un fármaco estimulante del sistema nervioso central.

La importancia del estudio, en este caso, es que el virus de la rabia causa casi el 100% de mortalidad en hombres y animales superiores, una vez que han sido infectados por el virus y comenzado las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad. Otra causa de la importancia de este estudio es el empleo del Metilfenidato en el tratamiento de niños con hiperactividad y disfunciones de aprendizaje, ya que si el fármaco afecta tanto "in vitro" como "in vivo", la replicación del virus de la rabia se podría esperar que a los niños con un tratamiento largo con Metilfenidato al vacunarlos no se obtengan los títulos adecuados para su protección.

En un estudio precedente se empleó un depresor del sistema nervioso central como es la Ketamina para ver el efecto sobre la replicación del virus, encontrándose que este fármaco afecta la replicación viral, pero no se dilucidó el mecanismo mediante el cual se ve afectada. En el presente trabajo se utilizó el Metilfenidato como fármaco a probar sobre el efecto en la replicación del virus de la rabia.

Con el fin de observar el efecto del fármaco sobre la replicación del virus de la rabia se diseñaron varios experimentos entre los cuales está el de inhibición de focos fluorescentes realizados con el virus de la rabia cepa Pasteur (PV) adaptado para crecer en células BHK 21 en presencia y en ausencia de Metilfenidato. Se observó que existe una disminución de focos fluorescentes al incrementarse la concentración del Metilfenidato en el medio de cultivo celular (figuras 1A y 1B).

En la titulación de los sobrenadantes del medio de cultivo celular inoculados con el virus realizado en ratones BALB/C por inoculación intracerebral, nos muestra que el grupo tratado con el sobrenadante del cultivo control, esto es, sin Metilfenidato cuando se determina su DL 50% es de $10^{7.35}$ /ml. el sobrenadante del virus cultivado con 60 ug/ml. de Metilfenidato nos muestra una disminución de más de tres unidades logarítmicas ya que se obtiene un título en su DL 50% de 10^4 /ml. en el grupo donde se utiliza el virus cultivado con una concentración de 120 ug/ml. de Metilfenidato nos da un título DL 50% de $10^{3.88}$ (figura 2).

Esto puede ser debido a la interacción del fármaco con el virus sea en forma equivalente y aun aumentando la concentración del fármaco ya no interaccione con el virus o posiblemente, la diferencia entre ambas concentraciones sea muy poca.. Nosotros esperábamos que a mayor concentración del Metilfenidato se obtuvieran títulos más bajos, con estos resultados obtenidos sugerimos que en trabajos posteriores se utilicen concentraciones más alejadas una de la otra.

En el experimento donde se utilizó el virus de la rabia cepa Pasteur, previo tratamiento con Metilfenidato y utilizando almidón como control, se observa que para este último grupo el título obtenido es de una DL 50% de $10^{9.67}$ /ml. y en el grupo tratado con Metilfenidato se obtiene un título DL 50% de $10^{5.39}$ /ml. Aquí se observa que el abatimiento en el título cuando se utiliza Metilfenidato es muy drástico, ya que hay una disminución de más de 4 unidades logarítmicas (figura 3).

Se podría pensar al ver los resultados obtenidos en la técnica de inhibición de focos fluorescentes que podría haber una competencia entre el fármaco y el virus por los receptores, tanto del virus como del fármaco, pero los experimentos que se realizaron con la misma cepa viral (PV) utilizando las técnicas antes mencionadas, nos hace pensar que posiblemente la acción del fármaco es directamente sobre el virus.

Esto es debido a que el fármaco a las concentraciones trabajadas no producen toxicidad sobre las células y al no verse afectadas éstas, al único que podría verse afectado es el virus.

Posteriormente al desafiar a los ratones BALB/C de 21 días de nacidos con el virus de la rabia cepa estandarizada CVS 11 por vía intraplantar en presencia de 1mg/ml. de Metilfenidato y llevando un grupo control a diferentes diluciones del virus, se observa que al administrar 0.03 mg. de Metilfenidato e inmediatamente después inocular el virus de desafío, existe una disminución en la mortalidad provocada por el virus al administrarse el Metilfenidato (figura 4), de igual forma al desafiar a los ratones con el mismo virus y 18 horas después administrarse el Metilfenidato se observa una disminución en la mortalidad provocada por el virus, aunque esta no es muy pronunciada. Al inocular el virus de la rabia cepa CVS 11 y 24 horas después administrar el Metilfenidato se observa una mortalidad del 85% para el grupo control y del 80% para el grupo tratado con el Metilfenidato (figura 6). Como se puede observar, esta diferencia no es muy significativa.

También al inocular una suspensión viral tratada con Metilfenidato y comparándola con un grupo testigo, se observa que para el grupo tratado con el fármaco se obtiene una mortalidad del 8.69% y para el grupo testigo la mortalidad es de 26.08% (figura 7). Estos resultados comparándolos con los anteriores son relativamente bajos, esto podría ser debido a alguna mala manipulación del virus durante su tratamiento como es, que no se trabajara a la temperatura ideal (baño de hielo) o que la suspensión viral no tuviera el inóculo adecuado.

En base a lo anterior, podemos pensar que el Metilfenidato va a afectar al virus únicamente cuando tiene un contacto directo con él y que a medida que pasa el tiempo entre inoculación del virus y administración

del fármaco el contacto entre ambos es menor y por consiguiente el virus se verá menos afectado.

De acuerdo a los resultados anteriores podemos decir que el Metilfenidato posiblemente actúa directamente sobre el virus, ya que en los grupos en los cuales el tiempo de inoculación del virus y la administración de Metilfenidato es mayor, la diferencia en cuanto a la mortalidad es menor; pero cuando el tiempo entre la inoculación del virus y la administración de Metilfenidato es menor, la diferencia que existe en la mortalidad de ambos grupos es mayor.

Se puede observar que cuando hay un mayor contacto entre el virus y el Metilfenidato, la mortalidad disminuye y a medida que pasa más tiempo entre la inoculación del virus y la administración del fármaco la posibilidad para que se de este contacto, disminuye.

Nosotros pensamos que la acción del fármaco es sobre la envoltura viral, ya que como se mencionó anteriormente el virus de la rabia es un virus envuelto y como se sabe, los virus envueltos dependen para su replicación en gran medida de la estabilidad de su membrana.

Según algunos estudios realizados con el Metilfenidato y el Paramixovirus (Aguilar S.) en proceso de publicación, al cultivar este virus en presencia de Metilfenidato se observa un incremento en la formación de células gigantes, cuando estas células y el virus no son tratadas con Metilfenidato se forman células multinucleadas aunque no son tan numerosas.

En cuanto a la producción de anticuerpos en ratones BALB/C de acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que al inocular la cepa vacunal Acallán V319 en presencia de un adyuvante ya conocido, como lo es el almidón existe un aumento en la producción de anticuerpos con respecto a un grupo testigo, a éste únicamente se

le inocula el virus. De la misma forma al inocular el virus en presencia de almidón y metilfenidato se observa que los niveles de anticuerpos producidos es semejante a los producidos cuando se inocula el virus en presencia de almidón, se podría pensar que el almidón protege al virus del efecto del Metilfenidato o bien, al provocar una migración de macrófagos que son células presentadoras de antígeno y encontrándose en mayor proporción de la normal existe un aumento en la presentación del antígeno, lo que nos da como resultado una inducción en la producción de anticuerpos. Cuando se inocula el virus en presencia del Metilfenidato se observa una disminución en los niveles de anticuerpos producidos con respecto a un grupo testigo (estos resultados son confiables con una $P < 0.10$). También al administrar el Metilfenidato por una vía diferentes (I.M.) a la vía de inoculación del virus (I.P.) no se observa que exista un efecto del fármaco sobre el virus, este experimento como se mencionó anteriormente fue para probar el efecto sistémico del fármaco sobre el virus y como se puede observar no hay un efecto significativo con respecto a un grupo testigo, por lo que pensamos, para que el Metilfenidato afecte al virus deben de ser inoculados por la misma vía y en el menor tiempo posible entre uno y otro.

Estos resultados nos sugieren que posiblemente la acción del Metilfenidato sea directamente sobre la envoltura viral y que posiblemente provoque una desestabilización de la glicoproteína ya que de acuerdo a los datos bibliográficos la glicoproteína tiene una gran importancia a nivel de replicación del virus, ya que es la responsable de la adherencia del virión a la célula huésped y al desestabilizarse esta proteína no se podrá llevar a cabo su replicación. Además también se menciona que es la responsable de la inducción en la producción de anticuerpos y una modificación en su estructura afectaría la producción de éstos. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a la producción de anticuerpos nos

inclina a pensar que el Metilfenidato afecta directamente a la glicoproteína.

Por comentarios personales (Dr. Elíseo Mendoza) se ha podido ver que si se trata a un virus envuelto con una anfetamina el virus pierde su envoltura y partiendo de que el Metilfenidato tiene un mecanismo bioquímico semejante al de las anfetaminas, no es difícil pensar en que el Metilfenidato provoque un desnudamiento del virus.

VI.- CONCLUSIONES

1. Al concluir este estudio se evaluó el efecto del Metilfenidato sobre la replicación del virus de la rabia, de diferentes cepas, por diferentes técnicas de acuerdo a lo propuesto al inicio del presente trabajo.
2. Se observa que al hacer los estudio "In vitro" de la replicación del virus de la rabia, existe una disminución en la formación de focos fluorescentes hasta de 180 unidades formadoras de focos fluorescentes, lo que nos indica que el virus ve afectada su replicación cuando se pone en presencia de Metilfenidato.
3. - "In vivo" se observa que el virus de afecta por la presencia del metilfenidato, dando títulos más bajos que los controles.
4. - Se concluye que el metilfenidato si afecta la producción de anticuerpos cuando se inocula una cepa vacunal atenuada en ratones en presencia de Metilfenidato, todos estos resultados tienen una $P < 0.1$.
5. - También podemos concluir que una administración del fármaco por una vía diferente a la de inoculación del virus no afectará su replicación, esto con una $P < 0.1$.

1. - Annalisa S., Mauro R., Bracci L. HPLC immunoaffinity purification of rabies virus glycoprotein using immobilized antipeptide antibodies. **J. of Immunological Methods**, 127, 131-138 1990.
2. -Anjaria J.M.; Jhala C.I. Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. **Int J.Zoon.**12. 267-275. 1985.
3. -Atanasiu P., Savy V. and Gibert C. Rapid immunoenzymatic technique for titration of rabies antibodies IgG and IgM results. **Med. Microbiol. Immunol.** 1978, 166, 201-208.
4. -Atanasiu P. et Perrin P. Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabiques: utilisation de la glycoprotéine rabique et de la protéine A conjuguées à la peroxydase. **Ann. Microbiol.** (Inst. Pasteur), 1979, A, 257-268.
5. -Bourhy and Sureau. Comparative field evolution of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **J. of Clin. Microb.** Mar. 1989. pp 519-523
6. -Brocier, B.M.; Languel B. Use of recombinant vaccine- rabies virus of fox cubs (*Vulpes vulpes*) against rabies. **Veterinary Microb.** 18, 1988.
7. -Brochier Bernard, Blancou Jean. Use of recombinant vaccine-rabies glycoprotein virus for oral vaccination of wildlife against rabies: Innocuity to several non target bait consuming species. **J. of wildlife dis.** 25 (4) 1989.
8. -Brochier, Blancou. Interaction between rabies infection and oral administration of vaccinia-rabies recombinant. **J. gen. virol.** 70, 1989.

- 9.-Constantine, D.G.: Rabies transmission by nonbite route. **Publ. Hlth. Rep.** 77, 287, 1962.
- 10.-Davis, B.D. Dulbecco, R., Elissen, H.N., Ginsberg H.S.: Tratado de microbiología, 2da. ed. 1978. Salvat editores. España 1391-1400.
- 11.-Dean, D.J.: Rabies, Bull. Org. Mon. **Santé-bull. Word Health Org.** 29,803 (1976).
- 12.-Debbie J. G.: La rabia: Un viejo enemigo al que podemos derrotar. Organización Mundial de la Salud (O.M.S.). Foro Mundial de la Salud, Vol. 9, 550-555. 1988.
- 13.-Denis Lacroix and André Ferron. Electrophysiological effects of methylphenidate on the coeruleo-cortical noradrenergic system in the rat. **European Journal of Pharmacology**, 149 (1988) 277-285. Montreal Canadá.
- 14.-Diccionario de Especialidades Médicas, ED. Ediciones PLM; Ed. 38a. México, 1992, pp. 1029-1031
- 15.-Dietzschold, B. Wunner, W.H.; Wiktor T.J.: Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proc. Acad. Sci. U.S.A.** 80, 70-74. 1983.
- 16.-Eckerman, Sheryl S. Moy, Ann N. Perkins, Kennerly S. Patrick and George R. Breese. Enantioselective Behavioral Effects of threo-Methylphenidate in Rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 40 875-880 U.S.A. 1991

- 17.-Espmark, A.; Grandien, M.: Others viruses In: Textbook of medical virology. Eds. Licke and Norrby E. Butten Worths and co. England. 336-337. 1983.
- 18.-Fenner, D.: Clasificación et nomenclature des virus. **Annual of Microbiology**. (Inst. Pasteur), 123, 323-332. 1976.
- 19.-Fischman, H. R.: Epidemillogy of rabies. **Amer. J. Epidem.** 88, 132. 1968.
- 20.-Fundenberg, Hung.: Inmunología Clínica. Manual Moderno. México. 1982.
- 21.-Hagan, W.A.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Prensa Medica Mexicana, 1, 689-705. 1975.
- 22.-Horstall, Frank.: Viral and Rickettsial infections of man. **Lippincot Company, USA.** 1965.
- 23.-Hummeler, K. And Koprowsky H. Investigating the rabies virus. **Nature**. (lond.), 221; 418, 1969.
- 24.-Hungund', J.M. Perel, M.J. Hurwic, J. Sverd'. B.G. Winsberg **Br. J. clin. Pharmac.** (1979) 8, 571-576
- 25.-Hutyra, Marek: Manual de Microbiología Médica. Manual Moderno. México; 689-703. 1973.
- 26.-Johnson, H. N.: The virus neutralization index test in mice. Chapter 8 in Laboratory technique in rabies. **World Health Organization**. 23, 3er. edition. Switzerland; 94-97. 1973.

- 27.-Joyce Blanck.: El maravilloso mundo de los perro. ED. Porrúa, México. 1-38. 1974.
- 28.-Kaplan, M. et al.: Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in the tissues culture; construction of a single. cycle growth curve. **J. Virol.** 1, 145. 1967.
- 29.-Kaplan. M. Demonstration of rabies virus in the tissue culture. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 98, 223. 1960.
- 30.-Koprowsky, H. Wiktor, T.J.: Monoclonal antibodies against rabies virus In: Monoclonal hybridomas. A New dimmension in biological analysis. Ed Kennet, RH. Pleneum Press. New York London. 1981.
- 31.-Koprowsky T.J., Kaplan. Rabia la, Técnicas de laboratorio. ED. O.M.S. 3era ed. 1976. pp. 12-13.
- 32.-Kucera, L. S.; Myrvik, Q. N.: Fundamental of medical virology, 3th ed. Lea and Febiger. USA. 136-141. 1978.
- 33.-López, B. y Hernández, E.: Pruebas de potencia para vacunas antirrábicas de irus vivo modificado de origen de cultivo celular. **Tec. Pec.** México, 29, 105. 1975.
- 34.-Lepine, P: Diagnóstico histopatológico, la rabia. Técnicas de laboratorio. Editado por Kaplan, M. y Koprowsky, H. 58-66, 3a. ed. O.M.S., Ginebra. 1976.
- 35.-Luria, S.E.; Darnell, J.E.: Animal virus mulliplication; The RNA viruses In: General virology, 3th ed. John Wiley and Sons. USA. 327-338. 1978.
- 36.-Malaga, H. : Epidemiología de la rabia canina. **Bol. de la Ofic. Sanit. Panamer.** O.M.S. Washington, USA, 405-156. 1976.

- 37.-Merck Index, The. ED Merck and Co. Inc. 10a. Ed. Rahway, N.J. USA
1983 pp.874
- 38.-Monique L.B., Mireille L. Antiviral activity of monoclonal antibodies
especific for the internal proteins N and S rabies virus. **J.gen. virol.** 68.
3113-3127. 1987.
- 39.-Percy, D.H.: Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. **Am. J.
Vet. Res.** 31; 1, 145-156. 1970.
- 40.-Roman S.B., Blancou J. Evaluación de la Inmunidad conferida en
bobinos por una vacuna antirábica producida en cultivo celular a
partir de virus inactivados. **Vet. Mex.** 18; 207-213. 1987.
- 41.-Rupprecht, Glickman Lawrence. Epidemiology of rabies virus variant.
Am. J. Epidemiol. 126 (2) 1987.
- 42.-Shope R. E. Rabies Enigma: Human and animal disease control. **Apl.
Virolog.** New York. Academic Press.. 231-233. 1984.
- 43.-Superti F. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. **J. gen.
virolog.** 67, 1986 pp. 47-56.
- 44.-Vilchis, V: Epidemiología de la rabia en México. **Salud Pública de
México.** 16, 3; 407-418. 1981.
- 45.-Voigh A., Kleiner, F. D.: Zoonosis. Editado por Acribia Zaragoza; 252-
256. 1975.
- 46.-Vodopija I.: Current issues in human rabies immunization. **Rev. Int.
Dis.** 10, supplement 4; Nov-Dec: S758-S763. 1988.

- 47.-Wargin, K. Patrick, C. Killa., C. T. Gualtieri, K. Ellington, R. A. Mueller G. Kraemer and G. R. Breese. Pharmacokinetics of Methylphenidate in Man, Rat and Monkey. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 226, 2 USA. 1983.
- 48.-Wiktor T. J.: Monoclonal antibodies in rabies virus research veterinary viral diseases. Their significance in South-East Asia and the western Pacific. Ed. Della-Porta. Academic. Press. Australia; 374-381. 1985.
- 49.-Wiktor T.J. and H Koprowski. Antigenic variants of rabies . **J. exp. med** 1952 July 1980.
- 50.-Wunner W.H.: Purification and titration of Rhabdoviruses. In: **Virology: a practical approach**. Ed by MAHY B.W.J. IRL PRESS. Oxford- Washington D.C. 79-92. 1985.
- 51.-Wunner W.H.; Reagan K.J. and Koprowsky H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. **J. virol.**, 50 (3). 691-697. 1984.