

01672



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

829.

**EFFECTO DE LA INFECCION DEL VIRUS DE LA RABIA E
INOCULACION DE NUCLEOCAPSIDE SOBRE EL
CRECIMIENTO DE RATONES DE LAS LINEAS BALB/C,
C3H Y C57 BL/6.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS: MICROBIOLOGIA.

PRESENTADA POR:

BIOL. ADRIANA ELVIA MATA VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE.

COASESOR: LIC. AGUSTIN MONTAÑO GARCIA.



MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

26 6630



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

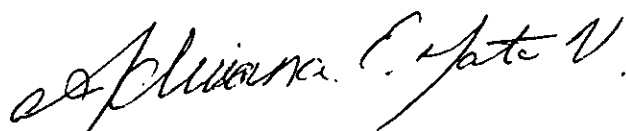
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



Biól. Adriana Elvia Mata Villegas

DEDICATORIA

A mi padre y madre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero darle las gracias a las siguientes personas por su apoyo moral y académico durante el desarrollo de esta investigación:

Q.F.B. Rebeca Milán Chávez, gracias amiguita por todo.

Dr. Juan Antonio Montaña, por su dirección en el desarrollo de esta investigación.

Dr. George M. Baer y al Dr. Gilberto Chávez, por la amable donación del virus CVS-11 utilizado.

Dr. Federico Martínez, por las facilidades dadas para la lectura de algunas pruebas bioquímicas y en el corrimiento electroforético de las cosechas de nucleocápside.

Dr. Alvaro Aguilar Setién, por apoyarnos en el momento preciso.

Dr. Alfredo Sahagun, por las facilidades para la ultracentrifugación de la nucleocápside y la lectura de las pruebas bioquímicas.

M. en C. Elizabeth Loza Rubio, por su apoyo.

M.V.Z. Claudia Verónica Rivera Cerecedo y a todos los que laboran con ella en el Bioterio del Instituto de Fisiología celular, por todas las facilidades prestadas en el mantenimiento de los ratones utilizados en esta investigación.

Dr. Carlos Villagran, por conseguir los ratones utilizados en esta investigación.

M.V.Z. Daniel Atilano, por su dirección en la elaboración de los corrimientos en Cellogel®.

M. en C. Elizabeth Morales, por su colaboración en la histología de las muestras de piel.

A todos mis amigos, porque siempre han estado conmigo en todo.

RESUMEN

Wiktor (1985) y Torres-Anjel (1988) describieron una pérdida de peso en ratones adultos y lactantes rabiosos. Torres-Anjel (1988) también hace mención a que en la rabia existe una disminución en la producción de somatotropina que causa el síndrome de emaciación. Montaña en 1993 (no publicado) observó que al inocular proteína N del virus de la rabia en ratones C57BL/6 éstos mostraban un aumento de tamaño. Se observó un efecto similar al inocular la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida. El objetivo de esta investigación fue el de comparar el efecto del virus de la rabia (CVS-11), de su nucleocápside (NC) purificada y de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida en el crecimiento de ratones de las líneas BALB/c, C3H y C57BL/6. La nucleocápside se purificó en gradientes de CsCl. Las concentraciones obtenidas fueron 0.5 y 1.5 mg/ml. Se inocularon ratones lactantes y adultos con el virus por vía intracerebral y con nucleocápside por vía intraperitoneal a crías recién nacidas comenzando el día de nacimiento hasta el día 4 y posteriormente los días 10 y 15 de edad. El período de observación fue de 21 días. Se realizaron mediciones de peso y longitud cada tercer día, al finalizar el período de observación se cuantificó la concentración de proteína total, glucosa y ácidos grasos libres en suero. Los ratones rabiosos de las tres líneas tanto lactantes como adultos mostraron disminución significativa ($p < 0.05$) en peso y longitud, se detectó también un alza significativa en la concentración sérica de proteína total y glucosa. La inoculación de la vacuna indujo un aumento en peso y longitud significativo ($p < 0.05$) en las tres líneas. No se detectaron diferencias significativas en los parámetros bioquímicos de estos individuos. Con 20 μg de NC (0.5 mg/ml), sólo se inocularon ratones lactantes BALB/c. Estos presentaron emaciación y muerte al sexto día de edad. Los inoculados con 60 μg /ml (1.5 mg/ml de NC) BALB/c mostraron un aumento en longitud y en la concentración de glucosa sérica estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Dos camadas de la línea C3H aumentaron significativamente ($p < 0.05$) en peso y longitud, la tercera sólo mostró diferencia en longitud. Los ratones C57BL/6 mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en peso y longitud. No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de proteína total, glucosa y ácidos grasos. Sin embargo, en corrimientos electroforéticos de las proteínas séricas se observaron diferencias significativas en la concentración de albúmina de los ratones rabiosos, los inoculados con vacuna y nucleocápside. Se realizó una búsqueda en las bases de datos GenBank y SwissProt donde se encontró una homología del 55% de la proteína N del virus rábico con serina/treonina cinasas. Los resultados obtenidos sugieren que la emaciación presentada por lo animales rabiosos puede ser debida a la disminución en la concentración de somatotropina o su hormona liberadora. Los signos observados en los ratones inoculados con 20 μg de NC pudieron deberse a un efecto de la proteína N como superantígeno (SAg), de forma similar a lo informado por McCormack *et al* (1993) para el SAg del tumor mamario del ratón. El aumento en la tasa de crecimiento de los ratones inoculados con vacuna o NC pudo deberse a que la proteína N contenida en éstas actuara como transductor celular, proteína estabilizadora de hormona del crecimiento o como mensajero intercelular o intracelular.

ABSTRACT

Wiktor (1985) and Torres-Anjel (1988) described a weight loss produced in animals with rabies. Torres-Anjel (1988) also reported a decrease in the production of growth hormone causing a "wasting syndrome". Montañó (1993, unpublished), observed an increase in the rate of growth when inoculating C57BL/6 suckling mice with protein N of rabies virus. A similar effect was obtained when suckling mice were inoculated with suckling mice brain vaccine (Fuenzalida). In this investigation the effect produced by this vaccine, purified nucleocapsid and the virus (CVS-11) was compared. Suckling and adult mice of the strains BALB/c, C3H and C57BL/6 were inoculated intracerebrally with the virus and only suckling mice were inoculated intraperitoneally with either vaccine or nucleocapsid. Virus was inoculated only once on day 0, meanwhile vaccine and nucleocapsid was inoculated on days 0, 1, 2, 3, 4, 10 and 15 starting on the day of birth. Mice were weighed and measured every other day during a period of 21 days. At the end of this time they were bled, the serum separated and titrated for total protein, glucose and free fatty acids. All mice inoculated with virus presented wasting syndrome characterized with weight and length loss. All the mice inoculated with vaccine presented statistical differences ($p < 0.05$) in weight and length. BALB/c and C57BL/6 mice inoculated with nucleocapsid had a significant ($p < 0.05$) increase in weight and length, meanwhile two of the three litters worked of C3H mice increased in weight and length, the third did not show any significant difference. Sera from rabid animals had significant variations in the concentration of protein and glucose. No difference was detected in sera from C3H and C57BL/6 animales inoculated with vaccine or nucleocapsid. Only BALB/c mice inoculated with nucleocapsid presented glycemia ($p < 0.05$). A 55% homology between protein N of rabies virus and serin/threonin kinase was detected (GenBank and SwissProt). Results suggest that the wasting syndrome observed in rabid animals was caused by a decrease in growth hormone. In mice treated with vaccine and nucleocapsid could have increased its weight and length because of the action of protein N of rabies virus contained in the nucleocapsid of this virus as a transductor, a binding protein to growth hormone or as a intercelular or intracelular messenger.

INDICE

	Página
Introducción:	1
• La nucleocápside del virus de la rabia	3
• Nuevas propiedades de la nucleocápside del virus de la rabia	4
• Antecedentes y fundamentación del trabajo de investigación	5
• La nucleocápside del virus de la rabia y la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida	8
• El crecimiento y algunos factores que lo inducen	
Objetivos	11
Hipótesis	12
Material y métodos:	13
I. Cultivos celulares	
- Células BHK-21	
II. Virus	
- CVS-11	
III. Ratones	
- BALB/c	
- C3HeB/FeJ	
- C57BL/6	
IV. Inóculos	14
1. Vacuna antirrábica tipo Fuenzalida	
- Uso canino	
- Uso humano	
2. Suspensión de cerebro normal	15
3. Replicación y titulación del virus	
4. Nucleocápside del virus de la rabia	16
V. Inoculación de ratones	18
A. Lactantes	
B. Adultos	
VI. Mediciones	19
1. Peso	
2. Longitud	
3. Proteína, glucosa y ácidos grasos	

VII. Histología	20
VIII. Análisis estadístico de los datos	21
A. Hipótesis	
-Análisis de covarianza	
-Análisis factorial	
B. Características de la investigación	
C. Coeficiente de confianza y error de aceptación	
D. Distribución muestral	
E. Programa estadístico utilizado	
Resultados:	23
1. La infección con virus rábico CVS-11 provoca pérdida de peso	
A. Lactantes	
B. Adultos	
2. La vacuna antirrábica tipo Fuenzalida promueve el crecimiento	24
3. La nucleocápside del virus de la rabia promueve el crecimiento	25
- BALB/c	
- C3HeB/FeJ	
- C57BL/6	
4. En algunas camadas se observan diferencias dependientes del sexo	26
- Inoculados con CVS-11	
- Vacuna antirrábica	
- Nucleocápside	
5. Aspectos bioquímicos	27
- Proteína	
- Glucosa	
- Acidos grasos	
6. Homología de secuencia de la proteína N con serina/treonina cinasas	28

Discusión:	30
1. La infección con virus rábico CVS-11 provoca pérdida de peso en ratones lactantes adultos	
2. La vacuna antirábica tipo Fuenzalida promueve el crecimiento de los ratones lactantes	32
3. La nucleocápside del virus de la rabia promueve el crecimiento de los ratones lactantes	34
3.1 Actividad análoga a la hormona del crecimiento o a la hormona liberadora del crecimiento	36
3.2 Función de transducción por su homología con cinasas	
3.2.1. A nivel hipófisis e hipotálamo	
3.2.2. En otros tejidos	
3.3 Estabilización de la hormona del crecimiento	38
3.4 Interacción entre proteínas virales, citocinas y hormonas	
4. Aspectos bioquímicos	41
4.1 Proteína total	
4.1.1. En animales rabiosos	42
4.1.2. En animales inoculados con proteína N	
4.2 Glucosa	43
4.2.1. En animales rabiosos	
4.2.2. En animales inoculados con proteína N	
4.3 Acidos grasos libres	
4.3.1. En animales rabiosos	
4.3.2. En animales inoculados con proteína N	
5. Influencia genética sobre la respuesta	45
Conclusiones:	46
• Patogenia de la rabia	
• La nucleocápside del virus de la rabia promueve el crecimiento	
1. Somatotropina o su hormona liberadora	47
2. Cinasas	
3. Mensajero intracelular en células de la hipófisis y/o hipotálamo	
4. Proteína estabilizadora de la hormona del crecimiento	
5. Transductor en células de otros tejidos	
6. Una nueva citocina	

• Factores que afectan la respuesta a la proteína N	48
- Edad	
- Sexo	
- Respuesta de las líneas de ratones utilizadas	
- Respuesta en diferentes especies animales	
- Dosis	
• Influencia de factores genéticos sobre la patogenia de la rabia a diferentes edades	49
• Propuestas para futuras investigaciones	
Apéndice A. Cuadros y gráficas de resultados	51
Apéndice B. Fórmulas de los reactivos utilizados	63
Bibliografía	70

INTRODUCCIÓN

El virus de la rabia está constituido por dos unidades estructurales y funcionales, una nucleocápside y una envoltura. Los componentes de la nucleocápside son: ácido ribonucleico (ARN), proteína N o nucleoproteína, proteína NS que es una fosfoproteína asociada a la nucleocápside y la proteína L que corresponde a la polimerasa viral. La envoltura se encuentra formada por lípidos de la célula hospedera, carbohidratos de la misma y glicoproteínas virales (proteína G) que son componentes transmembranales además de la proteína M o de matriz que se encuentra recubriendo internamente la membrana lipídica (Sokol, 1969), ver figura 1.

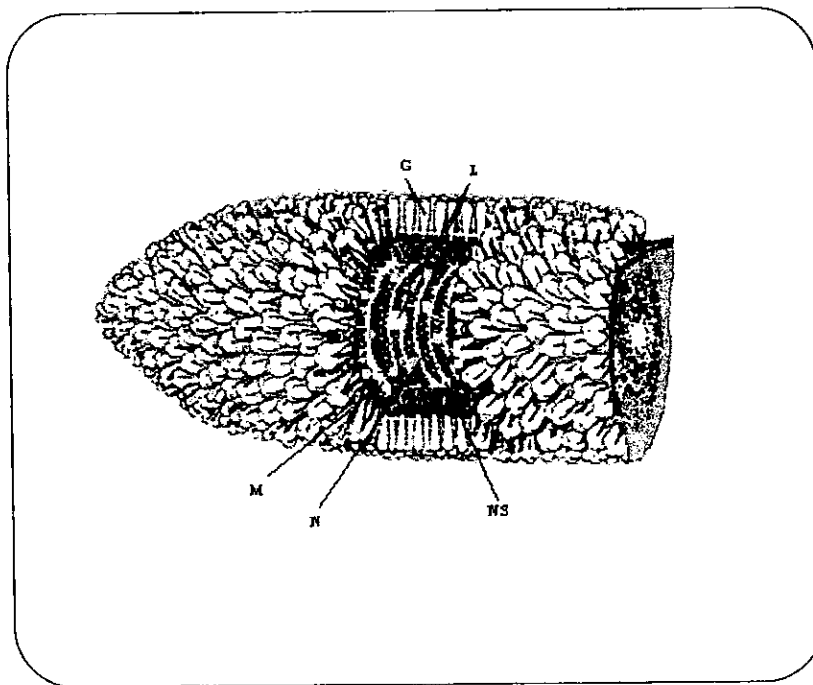


Figura 1. Estructura del virión de la rabia. Nucleocápside conformada por las proteínas N, NS, L (polimerasa viral) y M (de matriz). En la envoltura se encuentra la proteína G (modificado de Wagner *et al*, 1996).

Cada una de las cinco proteínas que constituyen el virus rábico está codificada por un gen en el ácido nucleico genómico (Rayssiguier *et al*, 1986). Una de las peculiaridades del genoma, es que entre los genes que codifican para la proteína G y L hay una región llamada pseudogen Ψ , que comprende

423 nucleótidos. Esta región es hipervariable y no codifica ninguna de las proteínas del virus; contiene además una señal para detener la transcripción (Morimoto *et al*, 1989), ver figura 2.

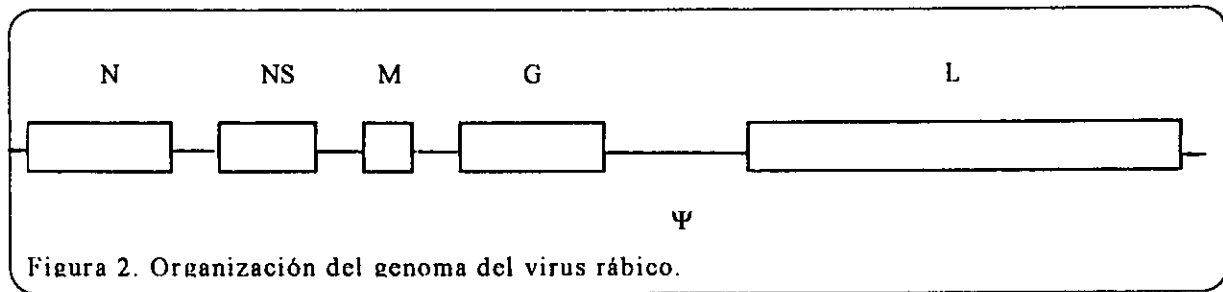


Figura 2. Organización del genoma del virus rábico.

La replicación del virus rábico *in vivo* está casi restringida al tejido nervioso y el neurotropismo es una característica de la infección rábica. Después de la inoculación intramuscular el virus se replica primariamente en las células del músculo estriado, para posteriormente entrar a nervios periféricos a través de los cuales viaja hacia la médula espinal y de ahí al cerebro. La penetración a los nervios periféricos sucede a través de las placas neuromotoras. Los nervios periféricos afectados son tanto motores como sensitivos (Coulon *et al*, 1989; Dietzschold *et al*, 1985; Seif *et al*, 1985). Al contrario de lo que sucede en la mayoría de las infecciones virales la presencia de anticuerpos neutralizantes, después de efectuada la infección del virus, no evita la diseminación de éste hacia el sistema nervioso central, debido a que el virus pasa de célula a célula a través de las uniones intercelulares sin salir al medio circundante donde quedaría expuesto (Dietzschold *et al*, 1985; Lafon & Lafage, 1987). Una vez que ha penetrado al sistema nervioso central queda protegido por la barrera hematoencefálica que restringe la entrada de células del sistema inmune y macromoléculas como los anticuerpos (Lafon & Lafage, 1987).

LA NUCLEOCÁPSIDE DEL VIRUS DE LA RABIA.

La proteína que se encuentra en mayor cantidad en la nucleocápside es la proteína N, constituyendo el 90 % de la misma y junto con la proteína NS constituyen la mayor parte de la nucleocápside (Dietzschold *et al*, 1987a). La proteína N está constituida por 450 aminoácidos (Dietzchold *et al*, 1987a; Tordo *et al*, 1986), la secuencia de éstos es poco variable a diferencia de la proteína G (Tordo *et al*, 1992). Sin embargo, desde un punto de vista antigénico, se pueden identificar los cuatro serotipos y los EBL-1 y EBL-2 en base a la proteína N (Montaño, 1994). Además representa el antígeno específico de grupo del género (Fekadu *et al*, 1992). Se encuentra asociada al ARN viral y a la proteína NS. No se encuentra glicosilada pero sí está fosforilada. Una función de la proteína N es la de proteger al ácido nucleico de los ataques enzimáticos, además de conferirle su estabilidad funcional. La proteína N además es el factor inductor de la replicación cuando se une a las proteínas NS y L, y da la señal para la transcripción de una cadena de ARN de polaridad positiva que se utiliza como molde para sintetizar el ARN genómico viral. La proteína N es la primera en ser sintetizada durante la replicación debido a su posición dentro del genoma, además de ser la que se produce en mayor cantidad; esto se debe probablemente a que tiene una importante función como protectora de los ARN genómicos de la progenie que son de polaridad negativa y deben ser protegidos de la acción de las ribonucleasas celulares y produce el cambio entre transcripción y replicación (Chenik *et al*, 1994; Dietzchold *et al*, 1987a; Minamoto *et al*, 1994).

En microscopía electrónica, la nucleocápside aparece en el virión, en forma de un cilindro de 165 nm de longitud formado por 30 a 35 vueltas de hélice muy cerradas (Murphy, 1975). Después de un choque térmico u osmótico, la nucleocápside se libera de la envoltura y se desenvuelve en un

filamento de 4.2 mm de largo (Sokol *et al*, 1969). La nucleocápside se produce en gran número en el citoplasma de las células infectadas; durante la transcripción y la replicación viral; puede ser liberada al medio extracelular por la lisis de la célula. Las primeras nucleocápsides son observables al microscopio electrónico y por inmunofluorescencia 5 horas después de la infección.

El ARN del virus de la rabia, cualquiera que sea su polaridad (ARN con sentido negativo genómico o ARN de sentido positivo utilizado como molde) está asociado a las proteínas N y NS que lo protegen de la actividad de las ribonucleasas, estas proteínas también existen en estado libre en el citoplasma de las células infectadas (Hummeler *et al*, 1967; Iwasaki *et al*, 1973).

NUEVAS PROPIEDADES DE LA NUCLEOCÁPSIDE DEL VIRUS DE LA RABIA.

Se ha demostrado que se puede inducir protección mediante la inmunización con proteína N aislada (siempre y cuando el virus de desafío sea inoculado por vía intramuscular), aunque los mecanismos que la confieren aún no son claros (Dietzschold *et al*, 1987b; Lodmell *et al*, 1989; Takita-Sonoda *et al*, 1993).

Más recientemente, se describieron las propiedades superantigénicas de la nucleocápside. La nucleocápside y su componente principal, la proteína N, son superantígenos (SAg) exógenos V β 8 en los humanos y V β 6 en los ratones BALB/c. Se ha visto que tiene una propiedad especial que es la de estimular la respuesta de anticuerpos contra otro epítipo, para inducir protección. (Lafon *et al*, 1992).

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

En 1993, al inocular ratones lactantes de la línea C57 BL/6 para un trabajo de investigación sobre las propiedades superantigénicas de la nucleocápside del virus de la rabia (publicado por Lafon *et al*, 1994), Montañó observó consistentemente un aumento en el tamaño y peso de los ratones inoculados en relación a los ratones controles (comunicación personal), ver figuras 3 y 4.

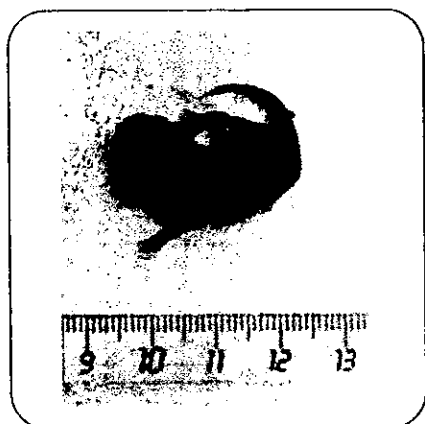
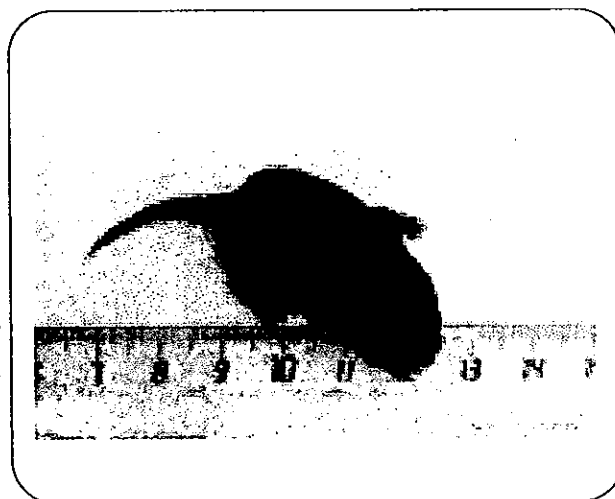


Figura 3. Ratón C57BL/6 testigo de 4 días de edad.

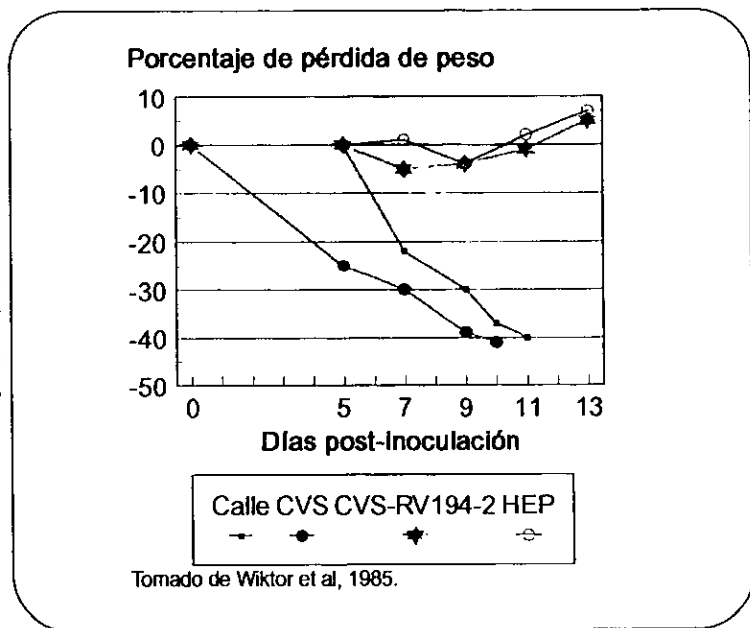
Figura 4. Ratón C57 BL/6 inoculado con 40 μ l de una preparación con 1.5 mg/ml de nucleocápside de virus rábico, vía intraperitoneal.



Los trabajos realizados por Wiktor y otros investigadores describen que el virus de la rabia produce una pérdida de peso y que ésta es una medida de la virulencia de la cepa involucrada. En un trabajo realizado por Wiktor y colaboradores para conocer más sobre la patogénesis del virus de la rabia, se inocularon diferentes lotes de ratones adultos por vía intracerebral con cuatro diferentes cepas de virus rábico: una cepa que no produce la enfermedad

(RV194-2), una cepa de baja virulencia (Flury HEP), y dos cepas virulentas (CVS y un virus de calle); midiéndose la pérdida de peso corporal a través del tiempo (Wiktor *et al*, 1985). En el texto se especifica que no existió ningún cambio en el peso corporal al utilizar las cepas Flury HEP y RV194-2 (avirulentas). Mientras que al utilizar las cepas virulentas hay una dramática pérdida de peso corporal, hasta del 40 %. Sin embargo, al analizar la figura correspondiente a este experimento se observa que en las cepas avirulentas no hay una pérdida de peso, pero entre los días 9 a 13 se alcanza a observar un aumento de peso de los mismos, ver figura 5. Si utilizamos la misma escala que tiene la gráfica pero en sentido ascendente el aumento de peso es de aproximadamente el 10 %.

Figura 5. Pérdida de peso resultante de la infección con cepas virulentas y avirulentas del virus de la rabia. Grupos de seis ratones fueron inoculados intracerebralmente (i.c.) con 10^4 UFP de los diferentes virus y se evaluó diariamente la pérdida de peso corporal.



En el texto no se hace referencia al hecho de que existió un leve aumento de peso, así como tampoco se discute más profundamente la pérdida de peso y sus causas. Sólo se explica que es una característica que diferencia a las cepas virulentas de las menos virulentas.

En trabajos posteriores que se refieren a la pérdida de peso corporal y al crecimiento en general de individuos infectados por el virus de la rabia se describe al síndrome de emaciación (*wasting syndrome*) (Perry *et al.*, 1990; Torres-Anjel *et al.*, 1986; 1987; 1988; Tshikuka *et al.*, 1992), llamado así debido a que produce pérdida de peso. Cuando se ha cultivado el virus de la rabia, tanto vacunal como de campo, en células de una línea derivadas de la pituitaria como la GH3 (tumor de la pituitaria de ratón), productora de la hormona de crecimiento, aunque no se puede ver un efecto citolítico en el primer pase, las células empiezan a aglutinarse espontáneamente y tendien a multiplicarse sin completar la mitosis y produciendo sincitios. Como consecuencia hay una disminución en la producción de hormona del crecimiento o somatotropina (Torres-Anjel, 1987). Esto también fue observado *in vivo*, en rabia parálitica bovina (Tshikuka *et al.*, 1992). En estas experiencias no sólo se observa el retraso en el crecimiento y pérdida de peso corporal de becerros (Torres-Anjel, 1986), sino también una inmunosupresión similar a la observada en animales de laboratorio con rabia (Wiktor *et al.*, 1985). Sucesos similares han sido observados con otros virus como el de la leucemia felina y el VIH (Torres-Anjel, 1992). La explicación que dan los autores a sus resultados se basa en la disfunción celular causada por la replicación del virus, lo que provoca una disminución en la concentración de las proteínas producidas en dichas células, siendo secretadas cantidades menores. En el caso de la pérdida de peso ha quedado claro que no se debe a que los animales consuman menos alimento, ni a la parálisis que llega a provocar la enfermedad, por lo que se le atribuye en parte a la disminución de somatotropina circulante, a una secreción alterada de ACTH o a modificaciones en los mecanismos que la regulan (ambos procesos pueden presentarse), y a la destrucción de células linfoides en el timo, bazo y

linfonodos. Los mecanismos que producen estos efectos aun no han sido descubiertos ni descritos.

LA NUCLEOCÁPSIDE DEL VIRUS DE LA RABIA Y LA VACUNA ANTIRRÁBICA TIPO FUENZALIDA.

En un estudio realizado en el Instituto Pasteur por Montaña y colaboradores (1995), evaluando la concentración de nucleocápside en diferentes tipos de vacunas antirrábicas, se vió que la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida tiene una alta concentración de proteína N libre (entre 5.6 y 5.8 mg/ml). Al compararla con otros tipos de vacunas antirrábicas, la tipo Fuenzalida es la que contiene la mayor concentración de esta proteína.

EL CRECIMIENTO Y ALGUNOS FACTORES QUE LO INDUCEN.

El crecimiento es generalmente definido como la producción de nuevas células. Debido a que al crecimiento comúnmente se le mide como un incremento en masa, el crecimiento incluye no sólo la multiplicación celular, sino también agrandamiento de las células e incorporación de componentes específicos del medio ambiente. Por definición, el crecimiento incluye la deposición de grasa aun cuando la masa muscular es la de mayor importancia (Owen *et al*, 1993).

La complicada red que regula el crecimiento de los animales comprende la producción de somatotropina u hormona del crecimiento cuya función es la de inducir la síntesis de otros factores polipeptídicos secretados por el hígado y otros órganos que intervienen en el crecimiento celular sobre los diferentes tipos de tejidos. Entre los factores que estimula la somatotropina están las somatomedinas, que son los polipéptidos anteriormente mencionados como factores del crecimiento y entre los cuales se encuentran las hormonas

del crecimiento tipo-insulina, relaxina, factor de crecimiento de nervios, entre otros (Ganong, 1988). Algo de suma importancia para que puedan actuar dichos factores es la presencia y habilitación de los receptores de factores de crecimiento. Estos inducen señales químicas intracelulares que indican a las células que realicen ciertas funciones, como activar a factores de la transcripción y traducción (Guyton, 1986). Debido a esto se observan como consecuencia del aumento en la concentración de somatotropina los siguientes fenómenos químicos: aumento en la captación de aminoácidos, aumento en la síntesis de proteínas, reducción de la tasa de desintegración de las mismas, aumento del depósito de glucógeno, disminución de la utilización de glucosa para obtener energía y aumento en la utilización de ácidos grasos del tejido adiposo como fuente energética, aumento en la transcripción del ADN para formar ARN (Ganong, 1988; Guyton, 1986).

La somatotropina en adultos provoca específicamente la liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo y en consecuencia aumenta su concentración en los líquidos corporales. Además estimula en los tejidos la conversión de ácidos grasos a acetilcoenzima A, con la subsiguiente utilización de ésta para lograr energía. Por lo tanto, bajo la influencia de la hormona del crecimiento se utiliza grasa para obtener energía, en lugar de utilizar carbohidratos y proteínas. Sin embargo, en trabajos realizados por Harris y col. en 1993, se describe que al inocular repetidamente hormona del crecimiento en lechones y otros animales en crecimiento, no existe movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo, tampoco se presenta la biosíntesis de los mismos. Su conclusión es que existe una utilización inmediata de los ácidos grasos que entran al organismo a través de la dieta.

Algunos investigadores han considerado que la movilización de grasa producida por la hormona del crecimiento sería una de sus funciones más

importantes y consideran también que el factor de ahorro de proteína es el principal promotor del depósito de proteína y del crecimiento. La hormona del crecimiento, como otras hormonas proteínicas, varía considerablemente en estructura de una especie a otra (Guyton, 1986; Ganong, 1988). En el ratón el nivel en machos es de 7 a 63 ng/ml, mientras en las hembras existen entre 2 y 36 ng/ml (Foster, 1983).

Cuando existe una disminución en las reservas corporales de proteínas y carbohidratos aumenta la síntesis y secreción de hormona del crecimiento. La administración aguda de algunos aminoácidos, en especial de arginina, puede producir un incremento agudo de la secreción de la hormona del crecimiento (somatotropina).

Para favorecer la acción de la hormona del crecimiento se necesita de otras proteínas llamadas de unión, las cuales se unen a las hormonas e inducen su estabilización y activación, así como evitan su degradación por proteasas (Lowe, 1996).

OBJETIVOS

1. Comparar el efecto de la cepa virulenta (CVS-11) con el de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (testigo negativo) sobre la pérdida de peso corporal, la variación en longitud y niveles de glucosa, proteína y ácidos grasos libres¹ en ratones lactantes de las líneas BALB/c, C3H y C57BL/6.
2. Comparar la respuesta de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida sobre el peso y longitud, así como en los niveles en suero de glucosa, proteína total y ácidos grasos libres de ratones lactantes de las líneas BALB/c, C3H y C57BL/6.
3. Comparar el efecto de la proteína N contenida en la nucleocápside purificada a partir de la cepa CVS-11 sobre el peso y longitud corporales, así como en los niveles de glucosa, proteína y ácidos grasos libres en suero de ratones lactantes de las líneas BALB/c, C3H y C57BL/6.
4. Comparar la respuesta de cada línea genética de ratones a la inoculación de virus o proteína N.

¹ Los valores de estos parámetros bioquímicos en el suero serán utilizados para inferir el nivel de somatotropina.

HIPOTESIS

Hipótesis nula (H_0): El virus de la rabia causa pérdida de peso, la proteína N aislada de éste tiene un efecto significativamente igual.

Hipótesis alternativa (H_a): La proteína N del virus de la rabia causa un efecto sobre el crecimiento, significativamente diferente al del virus de la rabia.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. CULTIVOS CELULARES

Células BHK-21 C13. Son células de línea obtenidas originalmente de cultivos de riñones de hámsters recién nacidos (Mcpherson & Stocker, 1962)¹. Se trabajaron con medio MEM adicionado de 10% de suero fetal bovino y 1% de L-glutamina (200 mM), a 36,5°C y 5% de CO₂.

II. VIRUS

CVS-11. La cepa CVS (Challenge Virus Standard) deriva de la cepa original de Pasteur aislada en 1882 a partir de un bovino mordido por un perro, adaptada primero a cerebro de ratón y posteriormente a células BHK-21 por Kissling en 1958 (Kissling, 1958 citado por Tsiang en 1993). En esta investigación se empleó virus CVS-11², diluido 1:40,000 en PBS (100 mM, pH 7.4) y como testigo se usó el mismo PBS.

III. RATONES. Se utilizaron ratones de las líneas BALB/c, C3HeB/FeJ y C57BL/6³.

BALB/c. Ratones albinos singénicos (Eaves-Pyles & Alexander, 1997) desarrollados por Bagg en 1913. Presentan baja incidencia de tumores mamarios (10-20%); sin embargo, son susceptibles al virus del tumor mamario

¹ Donadas gentilmente por el MVZ César Villarreal Chávez, Director de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

² El virus utilizado fue donado por George M. Baer (Laboratorios Baer, S.A. de C.V.).

³ El Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, a través de su Secretario Académico, Dr. Raúl Mancilla, donó 8 parejas reproductoras de cada una de las 3 líneas de ratones utilizadas en este estudio y fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM a cargo de la MVZ Claudia Verónica Rivera Cerecedo (los inoculados con vacuna y nucleocápside) y el bioterio del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (los inoculados con virus).

del ratón. Pueden presentar varios tipos de tumores como ováricos, adrenales y pulmonares (Catálogo IFFA CREDO, 1993; Foster et al, 1981).

C3HeB/FeJ. Animales de color aguti, singénicos (Eaves-Pyles & Alexander, 1997), desarrollados en 1948 por Fekete, mediante la transferencia de óvulos de C3H/HeJ a C57BL/6. Presentan baja incidencia de tumores mamarios, aun cuando son altamente susceptibles al virus del tumor mamario del ratón. A partir de los 19 meses hembras reproductoras muestran la presencia de tumores en los ovarios en un 64 %. Concentración elevada de β endorfina y ACTH en la pituitaria (Catálogo IFFA CREDO, 1993; Foster et al, 1981).

C57BL/6. Ratones singénicos (Eaves-Pyles & Alexander, 1997) desarrollados por Little en 1921. Su pelaje y ojos son negros y son de talla pequeña. Pueden presentar alopecia parcial en placas redondas que es reversible. Raramente desarrollan dermatitis. Aunque no presentan cáncer mamario espontáneo, pueden presentar tumoraciones de diferente origen en baja incidencia después de los 18 meses de edad. Presentan una baja concentración de lípidos en las adrenales, tienen una alta actividad del complemento y de la glándula tiroidea; tienen débil actividad de acetilcolinesterasa, entre las 12 y 24 semanas presentan baja concentración de colesterol en el plasma. Presentan una baja proporción de células basófilas en la adenohipófisis y una elevada concentración de β endorfina y ACTH en la pituitaria (Catálogo IFFA CREDO, 1993; Foster et al, 1981).

IV. INÓCULOS

1. Vacuna antirrábica tipo Fuenzalida⁴. Este biológico no se utiliza en México desde 1997. Consiste en una suspensión inyectable de tejido nervioso de ratones lactantes infectados, con dos formulaciones:

⁴ Producidas por la Gerencia General de Biológicos y Reactivos, S.S.A. y donadas por la MVZ María de los Angeles Roa Riol, Directora del Centro Antirrábico Luis Pasteur.

- a) **Uso canino.** Producida con 3 cepas de virus rábico: 51, 91 y CVS. Las cepas 51 y 91 fueron aisladas en Chile en 1955 de un perro y un humano, respectivamente. La vacuna contiene timerosal 1:10,000 y fenol 1:1,000. La vacuna utilizada en este trabajo, con registro SARH n° B-5794-001, lote RC 230 y fecha de caducidad en junio de 1996, tenía una presentación de frasco multidosis de 20 ml (dosis: 2 ml).
- b) **Uso humano.** Es muy semejante a la vacuna para uso canino. Sin embargo, para aumentar su inocuidad, contiene solamente 10 mg/ml de la mezcla de tejido nervioso, los ratones lactantes son infectados a los 3 días de edad máximo, además la suspensión es centrifugada a 3,500 r.p.m. durante 10 minutos y a 10,500 r.p.m durante 10 minutos. La suspensión inyectable es inactivada por luz ultravioleta. Frasco ampula con 14 ml. Dosis: 1 ml. Lote: RH 150, fecha de caducidad: enero de 1996. Clave 3807.

2. Suspensión de cerebro normal. Fue preparada de manera estéril a partir de ratones lactantes albinos de 3 días de edad. Los ratones fueron sacrificados con éter y lavados en agua corriente, después se sumergieron en una solución de fenol al 5% durante 10 minutos. Los animales fueron nuevamente lavados con agua destilada estéril y secados en gasa estéril. Los cerebros fueron colectados mediante disección en una cabina de flujo laminar vertical y depositados en un frasco estéril, previamente identificado y tarado, mantenido en baño de hielo. El tejido se maceró en mortero de porcelana y se preparó una suspensión al 10% (p/v) en PBS 100mM, pH 7.8 estéril frío. La suspensión fue centrifugada a 8,000 *g* durante 10 minutos a 4°C, diluida al 2% y adicionada de timerosal 1:10,000 y fenol 1:1,000. Se realizaron pruebas de esterilidad.

3. Replicación y titulación del virus. El virus CVS-11 fue diluido 1/100 e inoculado en monoestratos de 6 botellas T_{80} (Nunc® o Falcon®)(5 ml/botella). Los cultivos infectados fueron incubados con medio MEM⁵ adicionado de 10% de suero

⁵ Las fórmulas de los reactivos utilizados se muestran en el apéndice B.

fetal bovino y 1% de L-glutamina (200 mM), a 36,5°C y 5% de CO₂. A los 5 días se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 180 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los detritos celulares. La cosecha se distribuyó en alícuotas de 1 ml, que se mantuvieron en nitrógeno líquido (-196°C).

El virus fue titulado por el método de formación de placas. En breve, se crecieron monoestratos de células BHK-21 en cajas de Petri de 60 mm. Se realizaron diluciones decimales seriadas de 10⁻² a 10⁻⁷ en medio completo. Se inocularon 100 µl de cada una de estas diluciones por caja de Petri. Las cajas se incubaron durante una hora a 36,5°C. Posteriormente se retiró el inóculo y se agregaron 4 ml de medio nutritivo-agarosa, el cual se dejó gelificar a temperatura ambiente. Los cultivos infectados se incubaron durante 6 días a 36,5°C, pasados los cuales se fijaron con formaldehído al 10% y se tiñeron con cristal violeta durante 3 minutos. Una vez lavado el colorante con agua corriente se procedió a contar las placas y obtener el título del virus.

El primer lote de virus también se tituló por el método de focos fluorescentes. Para ello se crecieron células BHK-21, y una vez confluyente el monoestrato, se tripsinizaron y se suspendieron a una concentración de 500,000 células/ml. De esta suspensión celular se tomaron 100 µl y se pusieron en contacto con 100 µl de una dilución del virus (se realizaron diluciones decimales seriadas de 10⁻² a 10⁻⁷). La mezcla fue sembrada en una placa de cultivo celular de 96 pozos con fondo plano. Se incubó durante 48 horas, para posteriormente retirar el medio de cultivo, fijar durante 30 minutos con acetona 70% e incubar con conjugado antirábico a base de anticuerpos monoclonales⁶. La lectura se realizó en un microscopio invertido con epi-fluorescencia⁷.

4. Nucleocápside del virus de la rabia. Se elaboraron 3 lotes según el método descrito por Sokol (1973). Para cada uno se infectaron 32 botellas T₁₇₅ con monoestratos confluentes de células con 5 x 10⁵ UFP contenidas en 10 ml. Las botellas fueron incubadas a 37°C durante una hora, se les retiró el inóculo y se

⁶ Adquirido en Laboratorios Baer.

⁷ En los Laboratorios Baer.

añadió medio MEM con 5% de suero fetal bovino y 1% de L-glutamina (200 mM) y nuevamente se incubaron durante 48 horas. Al final del período de incubación se desechó el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS estéril a 4°C y se desprendieron por medio de perlas de vidrio estériles y 5 ml de PBS. La suspensión obtenida se colocó en tubos de centrifuga de 50 ml.

La suspensión celular se centrifugó a 400 x *g* durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de PBS, se transfirió a otro tubo de centrifuga y se completó con PBS al volumen original. Esto se repitió dos veces más antes de proceder a adicionar 4 ml de agua destilada estéril fría (4°C) al sedimento celular y permitir que el agua lisara las células durante 10 minutos en refrigeración.

El lisado celular se transfirió entonces a un mortero de Tembroek colocado en un baño de hielo. Antes de desechar el tubo de centrifuga, éste se lavó con 1 ml de agua destilada estéril fría, que se colocó también en el mortero. Se realizó el macerado de las células infectadas, el cual se centrifugó a 700 x *g* durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se conservó en un tubo en refrigeración. El paquete celular se recuperó en 4 ml de agua destilada estéril fría y se maceró y centrifugó una vez más. Se mezclaron los sobrenadantes de cada una de las maceraciones y se centrifugaron a 10,000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. Se cosechó el sobrenadante.

En un tubo de centrifuga se colocaron 2 g de cloruro de cesio, al cual se le adicionaron 4.5 ml del sobrenadante obtenido y se mezcló suavemente hasta disolver todo el cloruro de cesio. Se procedió entonces a centrifugar durante 24 horas a 200,000 x *g* a 4°C, sin freno. Se obtuvieron dos bandas alrededor de la parte media del tubo de centrifuga (se pueden obtener una o dos), las cuales se colectaron con la ayuda de una micropipeta. El contenido de estas bandas se dializó frente a una solución amortiguadora NT (NaCl-Tris) pH 7.5 durante 24 horas. Se recuperó el dializado y se centrifugó nuevamente a

20,000 *x g* durante 24 horas. Posteriormente, se volvieron a coleccionar las bandas y a dializarlas frente a nueva solución amortiguadora.

La proteína obtenida se tituló por el método de Bradford (ver adelante; Bradford, 1976), para posteriormente realizar la dilución adecuada con el fin de obtener una concentración final de 1.5 mg/ml de proteína.

Para constatar que el dializado obtenido contenía proteína N purificada, se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel concentrador se utilizó al 4% y el separador al 12%. Ambos contenían un 10% de SDS. Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina (P.M. 68,000), ovoalbúmina (P.M. 45,000), gliceraldehído 3-P deshidratado (36,000), anhidrasa carbónica (29,000), tripsinógeno (24,000), inhibidor de tripsina (20,100) y α -lactoalbúmina (14,200). La proteína N tiene un peso molecular entre 58,000 y 62,000 daltones.

V. INOCULACIÓN DE RATONES:

A. Lactantes. En total, se utilizaron 30 camadas de 5 a 8 ratones. Cada camada fue dividida aleatoriamente en dos partes iguales, y cada parte recibió uno de los siguientes tratamientos:

- 0.04 ml de vacuna antirrábica tipo Fuenzalida para uso canino o suspensión de cerebro normal (SCN).
- Nucleocápside del virus de la rabia (60 μ g/0.04 ml) o solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4.

Cada individuo de la camada fue identificado y sexado antes de ser inoculado por vía intraperitoneal. Los animales se inocularon repetidamente los días 0, 1, 2, 3, 4, 10 y 15 de edad. El período de observación fue de 21 días.

- Virus de la rabia. Las crías se inocularon el día del nacimiento por vía intracerebral con 2,400 UFP, contenidas en 0.02 ml. Como testigo para los parámetros se utilizó PBS, 100 mM, pH 7.4.

B. Adultos. Se inocularon por vía intracerebral al menos 8 individuos de 21 a 25 días de edad de cada una de las líneas, previamente identificados y sexados. La dosis utilizada fue de 2,400 UFP de CVS-11, contenidas en 0.02 ml o PBS, 100 mM, pH 7.4. Se observaron diariamente hasta la muerte de los inoculados con virus rábico.

VI. MEDICIONES

1. Peso. Cada tercer día se registró el peso corporal total en décimas de gramos de cada uno de los animales, durante el periodo de observación de 21 días. Se utilizó una balanza granataria Ohaus modelo Harvard Trip Balance. El día de la inoculación se consideró como el día "cero".

2. Longitud. Se midió cada uno de los ratones con una regla cada tercer día, y la medida se registró en milímetros. Los ratones lactantes, hasta aproximadamente 15 días de edad, fueron sujetados de la piel del dorso del cuello; a mayor edad se les permitió asirse con las patas delanteras de una reja y se les sujetó de la cola.

3. Proteína, glucosa y ácidos grasos. Para cuantificar estos compuestos se sangró y separó el suero de los ratones inoculados, al finalizar el período de observación (día 21). Cada suero constituyó una lectura. Como valor inicial, para cada línea de ratones, se utilizó una mezcla de sueros de una camada de recién nacidos sin inocular. Los ratones adultos se sangraron antes de ser inoculados con el virus rábico y antes de sufrir la muerte durante la presentación de signos. Aquéllos inoculados con PBS fueron sacrificados por sangría en blanco el día en que el último de los rabiosos fuera sacrificado. Se utilizaron los siguientes métodos para evaluar estos parámetros:

a) Proteína (Método de Bradford). Este método se utilizó para la titulación tanto de los diferentes lotes de nucleocápside, como de los sueros de los ratones analizados. Como punto de referencia se realizó una curva patrón con valores

entre 1 y 0.00625 mg/ml de albúmina sérica bovina. Se colocaron 20 μ l de cada una de las muestras en una microplaca nueva de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular y se les adicionaron 150 μ l de reactivo de Bradford. Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura a una longitud de onda de 595 nm.

Así mismo estos sueros se analizaron por electroforesis en tiras de acetato de celulosa (Cellogel®). Para ello se utilizó solución amortiguadora de veronal sódico, pH 8.0. El tiempo de corrido fue de 25 minutos a 240 volts.

b) Glucosa. Los sueros se titularon por un método de glucosa oxidasa⁸. A 10 μ l de muestra se les agregó 1.5 ml de solución de enzimas y se dejó reaccionar durante 20 minutos. Como testigo se utilizó una curva estándar con concentraciones de 500 a 25 mg/ml. Posteriormente, se realizó la lectura a una longitud de onda de 490 nm.

c) Ácidos grasos libres. Se utilizó un paquete comercial de Boehringer-Mannheim (catálogo n° 1383175), acilación de los ácidos grasos libres be presencia de ATP. Se utilizaron 10 μ l de muestra y se siguieron las instrucciones del proveedor. La curva control se hizo a partir de ácido palmítico a una concentración de 10 a 0.0781 mg/ml. La lectura se realizó a una longitud de onda de 595 nm.

VII. HISTOLOGÍA.

Se tomaron las pieles de ratones C3H inoculados con vacuna y C57BL/6 inoculados con 60 μ g de nucleocápside. Estas se fijaron en formaldehído al 10% y luego fueron procesadas e incluidas en parafina para realizar cortes histológicos, que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y otros con la tinción de Fontana-Masson (que tiñe de negro la melanina)⁹.

⁸ Con reactivos amablemente donados por la Q.F.B. Rebeca Milán Chávez.

⁹ La histología la realizó la M. en C. Elizabeth Morales, en el Departamento de Histología

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

- ♦ Para evaluar las diferencias en cuanto a los niveles de proteína, glucosa y ácidos grasos libres en suero se utilizó un modelo de análisis de varianza factorial simple (para los ratones lactantes) y con covariable (para los animales adultos).
- ♦ Para evaluar las diferencias de peso y longitud, se realizó un análisis de varianza factorial completamente aleatorizado.
- ♦ La evaluación del efecto de línea genética sobre el peso y longitud de los ratones se hizo a través de una comparación gráfica.

A. Hipótesis.

1. Análisis de Covarianza.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

La nucleocápside o virus completo activo, según sea el caso, no produce ningún efecto sobre el nivel de glucosa, proteína o ácidos grasos libres séricos.

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

La nucleocápside o virus completo activo, según sea el caso, produce un efecto sobre el nivel de glucosa, proteína o ácidos grasos libres séricos.

2. Análisis Factorial.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

La nucleocápside o virus completo activo no produce ningún efecto sobre el peso o la longitud de los ratones.

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

La nucleocápside o virus completo activo produce un efecto sobre el peso o la longitud de los ratones.

B. Características de la investigación.

El proceso estadístico de la investigación presenta las siguientes características:

- a) Análisis de varianza en un sistema completamente aleatorizado.
- b) Una muestra grande de 20 ratones por análisis.
- c) Medición de razón con valores continuos dados en gramos para el peso, milímetros para la longitud de los ratones y mg/ml para las concentraciones de proteína, glucosa o ácidos grasos libres.

C. Coeficiente de confianza y error de aceptación.

La investigación se hizo con el 95% de confianza que equivale a un 5% de error de significancia.

Se aceptó un error del 5% en las estimaciones de los intervalos de confianza.

D. Distribución muestral.

Se utilizó la distribución F de Fisher como base de medición de la hipótesis nula y la distribución normal para establecer los límites mínimo y máximo de los intervalos de confianza.

E. Programa estadístico utilizado.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics, versión 5.0.

RESULTADOS

1. LA INFECCIÓN CON VIRUS RÁBICO CVS-11 PROVOCA PÉRDIDA DE PESO

Se produjeron dos lotes de virus, ambos con un título de 5×10^7 UFP/ml por el método de unidades formadoras de placa. El primer lote se tituló también por el método de focos fluorescentes y dio un título de 4.35×10^7 FF/ml.

- a) Lactantes. En las tres líneas, los animales de las camadas inoculadas con virus mostraron una pérdida promedio del 35% de su peso a los 6 días de edad en relación al tercer día de edad (en que alcanzaron su máximo peso) ($p < 0.05$). El séptimo día no se realizaron las mediciones porque se encontraban muertos. También se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a su longitud (Tablas 1, 2 y 3). Antes de la muerte de los animales enfermos, éstos mostraron signos nerviosos como parálisis y en ocasiones convulsiones; se confirmó la presencia del virus en improntas tanto de los animales con rabia como de los testigos, encontrando evidencia del virus sólo en los encéfalos de los ratones inoculados con CVS-11.
- b) Adultos. Las tres líneas de ratones mostraron una pérdida del 20% de su peso que, aun cuando no tan marcada como en el caso de los lactantes, sí es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) (Tablas 1, 2 y 3). Así mismo, se observó diferencia significativa en la longitud. Al igual que en los ratones lactantes, se observaron signos nerviosos además de pelo hirsuto antes de la muerte de los adultos. Como con los animales lactantes, se confirmó la presencia del virus, observando virus sólo en cerebros de ratones inoculados con CVS-11.

2. LA VACUNA ANTIRRÁBICA TIPO FUENZALIDA PROMUEVE EL CRECIMIENTO

En una investigación anterior se comparó el efecto de la inoculación de vacuna tipo Fuenzalida tanto para uso en humanos como en caninos. Los resultados obtenidos mostraron una mayor eficiencia en la promoción del crecimiento al utilizar la de uso en caninos (datos no mostrados). Por lo tanto, en esta investigación se utilizó solamente esta última.

Unicamente se inocularon ratones lactantes:

- a) BALB/c. Mostraron una diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a sus testigos (Cuadro 1; figura 6), tanto para peso como para longitud.
- b) C3HeB/FeJ. Mostraron una diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a sus testigos (Cuadro 2 ; figura 7), tanto para peso como para longitud. Se observó que al primer día de edad su piel mostraba una pigmentación más oscura que la de los testigos.
- c) C57BL/6. Mostraron una diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto a sus testigos (Cuadro 3; figura 8), tanto para peso como para longitud. Se observó que al primer día de edad su piel mostraba una pigmentación más oscura que la de los testigos.

Para averiguar si el cambio de coloración observado en las líneas C3H y C57BL/6 se debía al nacimiento prematuro de pelo o a la presencia de una mayor concentración de melanina se realizaron cortes histológicos. En ellos se comprobó que la diferencia en pigmentación se debió a ambas circunstancias. En los cortes se observó un engrosamiento de la piel de los ratones inoculados con vacuna (figura 9) o nucleocápside por lo cual hay un mayor número de folículos pilosos con melanina que los encontrados en la piel de los testigos. A mayor aumento (40x) se observó también la presencia de nacimiento de pelo dentro de los folículos, mientras en los testigos no existe evidencia de esto (figura 10).

3. LA NUCLEOCÁPSIDE DEL VIRUS DE LA RABIA PROMUEVE EL CRECIMIENTO

Se produjeron tres lotes de nucleocápside. Cada uno de ellos mostró 2 bandas de nucleocápside durante su purificación en cloruro de cesio. El rendimiento en proteína de cada lote fue:

Lote 1: 0.5 mg/ml, es decir, 20 μ g en 0.04 ml

Lote 2: 5.4 mg/ml

Lote 3: 4.8 mg/ml

Los lotes 2 y 3 fueron diluidos para obtener una concentración final de 1.5 mg/ml, es decir, 60 μ g/0.04 ml.

- BALB/c. Con el lote 1 de NC (conteniendo 20 μ g en 0.04 ml) sólo se trabajaron ratones lactantes de esta línea (3 camadas, n=10). Al séptimo día de edad, el 90% de los ratones inoculados con la NC murieron, el restante 10% sobrevivió hasta el día 13. Los ratones de las 3 camadas inoculadas con la NC mostraron una pérdida del 18% y 13% en peso y longitud respectivamente en relación al día anterior, mientras los testigos continuaron con un crecimiento normal (figura 6). Se detectaron diferencias significativas en ambos parámetros (Cuadro 1).

Los inoculados con 60 μ g/0.04 ml de NC (lote 2, 1 camada de 12 animales), se comportaron de manera contraria a los inoculados con 20 μ g, pues mostraron un aumento estadísticamente diferente en longitud, aunque no en peso (Cuadro 1).

- C3HeB/FeJ. Se trabajaron 3 camadas cuyo comportamiento fue distinto entre ellas. En una se observaron diferencias significativas tanto para peso como para longitud. Sin embargo, las otras dos sólo mostraron dicha diferencia en uno de los dos parámetros (Cuadro 2; Fig. 7). En este caso también se observó un cambio de pigmentación en todos los animales inoculados con NC desde el primer día de edad (Fig. 7).

- C57BL/6. Al igual que en el caso de los ratones C3H se trabajaron 3 camadas de ratones (n=19). Una de las madres presentó placas alopécicas durante la lactancia de sus crías (n=5). Los ratones inoculados con nucleocápside aumentaron en peso y longitud significativamente ($p < 0.05$) con respecto a sus testigos (Cuadro 3). Las tres camadas se comportaron de la misma manera.

4. En algunas camadas se observan diferencias dependientes del sexo

Se tomó como un factor en los análisis estadísticos. La inoculación de vacuna o nucleocápside en algunas camadas produjo una diferencia significativa en el crecimiento relacionado a sexo. En algunas camadas estimuló más a las hembras y en otras a los machos.

- Inoculados con CVS-11. Los ratones lactantes machos BALB/c fueron más sensibles que las hembras, mientras en los C3H se manifestó lo contrario. En ratones adultos BALB/c los machos fueron más resistentes, observándose lo contrario en los C3HeB/FeJ; y en los C57BL/6 tanto en lactantes como adultos no se detectaron diferencias significativas.
- Vacuna antirrábica. En los ratones de las líneas BALB/c y C3HeB/FeJ no se detectaron diferencias significativas. En sólo una de las camadas de C57 BL/6 inoculados con vacuna se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) dependientes del sexo.
- Nucleocápside. En los ratones BALB/c no se detectaron diferencias significativas. Dos de las camadas de ratones C3HeB/FeJ mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), sin embargo, en una aumentaron más las hembras que los machos en ambos parámetros mientras en la otra se observó lo contrario. En una de las camadas de C57BL/6 se observó

que los machos aumentaron más en peso y longitud a las hembras, siendo esta diferencia significativa.

5. Aspectos bioquímicos

- Proteína. Los resultados obtenidos para cada una de las camadas trabajadas se analizaron separadamente. Los únicos grupos que mostraron diferencias significativas fueron los correspondientes a los ratones inoculados con virus tanto lactantes como adultos (Cuadro 4, figura 11).

Aun cuando no se detectaron diferencias estadísticas en la concentración total de proteína de los animales, al analizar sus componentes en corrimientos electroforéticos (figuras 12, 13 y 14 c) se observaron diferencias.

El suero de los animales rabiosos tanto lactantes como adultos de las líneas BALB/c y C3H mostraron una elevación en la concentración de albúmina, significativa con respecto a la de los ratones testigos (figuras 12 y 13 a).

En el caso de los ratones inoculados con vacuna antirrábica tipo Fuenzalida se observaron también aumentos en la concentración de albúmina estadísticamente diferentes en las tres líneas utilizadas. Dichas diferencias se encontraron entre los inoculados con vacuna y aquéllos con SCN y PBS (figuras 12, 13 y 14 b). En los ratones BALB/c y C3H se observaron también diferencias significativas entre los valores obtenidos con vacuna y los de nucleocápside (figuras 12 y 13 b).

Los valores de albúmina de todos los ratones inoculados con nucleocápside, fueron estadísticamente mayores a los de aquéllos inoculados con PBS (figuras 12, 13 y 14 b). Con excepción de los ratones C57BL/6, no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de

albúmina de ratones inoculados con nucleocápside y los inoculados con SCN (figura 12, 13 y 14 b).

Las tres líneas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones de albúmina en ratones inoculados con SCN y PBS (figuras 12, 13 y 14 b).

Las líneas C3H y C57BL/6 mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de los ratones inoculados con PBS y SCN (figuras 13 y 14 b).

- Glucosa. Se detectó un aumento significativo sólo en los ratones lactantes BALB/c inoculados con 60 μg de NC y en aquéllos inoculados con virus (lactantes y adultos) de las líneas BALB/c y C3H (cuadro 5, figura 15).
- Ácidos grasos. No se detectaron diferencias significativas en ningún grupo.

6. Homología de secuencia de la proteína N con serina/treonina cinasas

Se realizó una búsqueda de la secuencia aminoacídica de la proteína N del virus de la rabia en el banco de datos del GenBank y del Swiss Protein Bank, a través de la internet (Entrez Browser, con dirección en <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). Una vez obtenida la secuencia de esta proteína (según Kissi y col, 1995) se utilizó una de las herramientas disponibles en esta página de la red (EPFL a través de la red BLAST), para hacer una comparación entre la proteína N del virus y todas las proteínas contenidas en las bases de datos antes mencionadas. Como resultado se obtuvo información de que existe un 55% de homología entre esta proteína y tres serina/treonina cinasas de *Mus musculus*: serina treonina cinasa de

timo, proteína cinasa C de cerebro y proteína cinasa C tipo theta. La alineación de las secuencias se muestra en el apéndice A, figura 16.

También se realizó una investigación sobre la función de los sitios de las proteínas cinasas que mostraron homología con la proteína N del virus rábico. Así, según la comparación con las descripciones de Altomare D.A. y col. (1995), Rose-John S. y col. (1988) y Osada S. y col. (1992), respectivamente, los segmentos en donde se detecta homología con la proteína N del virus rábico corresponden al sitio activo de estas proteínas.

Discusión

1. LA INFECCIÓN CON VIRUS RÁBICO CVS-11 PROVOCA PERDIDA DE PESO EN RATONES LACTANTES Y ADULTOS.

El virus de la rabia causa un desgastamiento general así como una pérdida de peso de alrededor del 40% en animales de laboratorio. Este fenómeno fue descrito primero por Wiktor en 1985 y posteriormente por Torres-Anjel *et al* (1988), Perry y col. (1990) y Tshikuka y col. (1992). Torres-Anjel y col. en 1988 lo denominaron síndrome de emaciación. En esta investigación se observó una pérdida promedio de peso del 35% y del 20% en ratones lactantes y adultos respectivamente; también se detectó una disminución en la talla de los animales. La hipótesis del grupo de Torres-Anjel (1986 y 1987) para explicar la pérdida de peso está basada en la disfuncionalidad de células productoras de la hormona del crecimiento, y sugieren la participación del eje hipotálamo-adenohipófisis-hormona del crecimiento-timo. Ellos probaron que aunque hay una considerable pérdida de peso ésta no se debe a la falta de consumo de alimento ya que los animales utilizados (conejos, ratas, ratones, bovinos y cuyes) continuaron alimentándose hasta el día de su muerte. Lo anterior concuerda con lo observado durante este trabajo, ya que en los animales lactantes se podía observar el estómago repleto de leche y a los adultos se les vio comer en varias ocasiones. Esto muestra la necesidad de realizar estudios comparativos de conversión alimenticia en animales sanos y enfermos de rabia.

Torres-Anjel y su grupo (1988) también demostraron que el virus rábico produce una disfunción de células de la adenohipófisis tanto *in vivo* como *in vitro*, las cuales están directamente relacionadas con el crecimiento ya que son las responsables de la producción de hormona del crecimiento.

El crecimiento se encuentra regulado principalmente por la hormona del crecimiento. Sin embargo, sin la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, ésta no podría llevar a cabo su función (Ganong, 1986; Guyton, 1991). La hormona del crecimiento es secretada por la pituitaria anterior y el hipotálamo. El hipotálamo produce también la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (Harris *et al*, 1966).

El virus de la rabia infecta células nerviosas. Torres-Anjel *et al* (1988) describieron la infección masiva de la adenohipófisis e hipotálamo en bovino, gato, conejo y rata, después de la inoculación intracerebral o intralingual con virus de la rabia. Los virus utilizados por este grupo fueron: virus de rabia parálitica bovina (ATCC VR-985), Con-Vac (Connaught Laboratories, Willodale Ontario Canada), Neurogen (Philips-Roxane, St. Joseph, Mo.) y CVS (ATCC VR-321). Por otra parte, Marquette *et al* (1996) a partir de estudios en ratones inoculados por vía intracerebral con CVS derivado de la cepa original de Pasteur, observó que hay replicación en el hipotálamo, mas no en la adenohipófisis. Al parecer la inoculación por diferente vía permite que el virus se replique en diferentes estructuras.

La energía de las células nerviosas infectadas se utiliza en la producción de proteínas virales, sin que se detenga la de las celulares (Tsiang H., 1993). Esto no implica que no exista una disminución en la secreción de proteínas celulares por las células infectadas como fue observado por Torres-Anjel y colaboradores en 1988. Al verse afectada la función del hipotálamo por la multiplicación viral, puede disminuir su actividad productora de hormona liberadora de somatotropina y otros factores, con la consecuente disminución de hormona del crecimiento circulante.

Al reducirse la secreción de hormona liberadora de somatotropina o la producción de hormona del crecimiento también se disminuye la secreción de insulina y factor de crecimiento tipo insulina-1. Esto produce una menor captación de glucosa (que se observa como glucemia), una disminución en la síntesis de proteína y un aumento en la degradación de ésta (Guyton, 1986; Ganong, 1988).

A pesar de los diversos reportes sobre la pérdida de peso inducida por el virus de la rabia, en ninguno de ellos se describe la disminución de longitud. Esta fue mucho más evidente en ratones lactantes, como consecuencia de un retraso en el crecimiento, que en adultos jóvenes.

Se sabe (Guyton, 1986; Ganong, 1988) que uno de los efectos principales de la hormona del crecimiento se da sobre las células óseas. Así, se puede deducir que al disminuir la concentración de hormona del crecimiento o alguno de sus intermediarios (somatomedinas) no se alcanzan a desarrollar adecuadamente los huesos (ya que interviene en la maduración de los osteocitos) o se retrasa el desarrollo global de los mismos, que podría ser quizá lo que sucede.

2. LA VACUNA ANTIRRÁBICA TIPO FUENZALIDA PROMUEVE EL CRECIMIENTO DE LOS RATONES LACTANTES

Al inocular vacuna antirrábica tipo Fuenzalida se observó la inducción del crecimiento de los ratones de las tres líneas significativamente mayor ($p < 0.05$) al de los testigos. Este aumento fue tanto en peso como en longitud. Esto puede ser debido al aumento en la secreción de uno o varios de los siguientes factores hormonales: hormona liberadora de somatotropina, hormona del crecimiento, factores de crecimiento tipo insulina, insulina y relaxina principalmente.

Los ratones C3H y C57BL/6 mostraron un cambio en la pigmentación de la piel desde el primer día post-inoculación y se observó un color más oscuro que el de los inoculados con una suspensión de cerebro normal. Al realizar cortes histológicos de la piel de estos individuos se observó que en los inoculados con vacuna era más gruesa y los folículos presentaban nacimiento de pelo, mientras la de los testigos era más delgada y no se pudo encontrar evidencia de nacimiento de pelo. El cambio de coloración por lo tanto a una mayor concentración de melanina debido a la mayor cantidad de melanocitos y a la presencia de pelo. Esto es indicativo de que también se estimularon factores de crecimiento de tipo epidérmico, los cuales son producidos en respuesta a la estimulación de hormona del crecimiento y factores del crecimiento tipo insulina (Lowe, 1996).

La vacuna antirrábica tipo Fuenzalida contiene todas las proteínas del virus rábico debido a que se produce a partir de encéfalos infectados de ratones lactantes (Fuenzalida y Palacios, 1955). Sin embargo es rica en proteína N libre (Montaño *et al*, 1995), que es el componente mayoritario de la nucleocápside y del virus (Dietzchold *et al*, 1987a). Además de la nucleocápside rábica, la vacuna contiene proteínas propias del tejido nervioso. Así, se considera la presencia de factores de crecimiento producidos en el encéfalo y se puede deducir que de haber una estimulación por parte de la nucleocápside en la producción de hormona del crecimiento, podría darse además un efecto sinérgico entre ésta y los factores de crecimiento intrínsecos del extracto celular encefálico.

La vacuna antirrábica tipo Fuenzalida contiene también proteína L (aunque en mucho menor cantidad que proteína N) del virus de la rabia. McClure y Perrault en 1989, analizaron dos regiones de la proteína L del virus de la estomatitis vesicular, las cuales corresponden a los sitios catalíticos de

las proteína-quinasas. La primera región es la de los residuos aminoacídicos 725 a 1102 y la segunda comprende del 1291 a 1671. Después de eliminar una secuencia de 94 residuos, que impedía la alineación, reportaron que la primera región alineaba mejor con miembros de la subfamilia Abl de las tirosina-quinasas (especialmente con las proteínas Fes y Fps), mientras la segunda región lo hacía con el factor de crecimiento de las plaquetas y la proteína Kit. Encontraron la misma homología (aproximadamente 20%) para el virus de la rabia y otros Rhabdovirus. Los autores de este trabajo llegaron a la conclusión de que las polimerasas de los Rhabdovirus, comparten ciertos residuos que podrían hacer pensar en una relación entre las tirosina-quinasas Fes y Fps, el factor de crecimiento de las plaquetas y la proteína Kit. La proteína L del virus de la rabia, al tener cierta similitud con transductores celulares como Fes y Fps y con un factor de crecimiento, también pudo haber contribuido al efecto de crecimiento observado en los animales inoculados con la vacuna.

3. LA NUCLEOCÁPSIDE DEL VIRUS DE LA RABIA PROMUEVE EL CRECIMIENTO DE LOS RATONES LACTANTES.

Los primeros experimentos con nucleocápside se realizaron inoculando 20 µg de proteína. Los ratones inoculados con este coloide murieron con una marcada pérdida de peso y de longitud en un período promedio de 7 días¹. La proteína N contenida en la nucleocápside del virus es un superantígeno (Lafon et al, 1992) y pudo haber actuado de manera similar al superantígeno del virus del tumor mamario del ratón. McCormack y colaboradores en 1993, observaron que al inocular superantígeno endógeno del virus del tumor mamario del ratón en concentraciones bajas,

¹ Hubo un solo ratón que sobrevivió hasta el día 13 post-inoculación.

causa una mayor depleción de linfocitos T maduros que a concentraciones alta y que su efecto es inversamente proporcional a la concentración aplicada. Otro detalle importante de destacar, es que esto fue observado cuando el superantígeno se aplicó repetidamente de forma exógena, como fue hecho con la nucleocápside del virus de la rabia. Se puede suponer que ésta es una de las posibles causas debido a que al inocular 60 μg de nucleocápside, los animales no sufrieron enfermedad y no murieron, se conservaron vivos sin ningún signo de enfermedad. Astoul *et al* en 1996, inocularon ratones BALB/c de 8 semanas con 20 μg de nucleocápside en 100 μl , sin embargo, esta proteína se combinó con 5 μg de hemoaglutinina de virus de Influenza y observaron que la proteína N actuaba como adyuvante. Una posible explicación de la diferencia de resultados es que Astoul y colaboradores utilizaron ratones adultos, los cuales son menos sensibles al tratamiento, además de que la proteína N no se inoculó sola sino en combinación con hemoaglutinina.

Otra explicación de la muerte de estos animales pudo haber sido que el inóculo estuviera contaminado. Para eliminar esta posibilidad se realizaron pruebas de esterilidad a la proteína después de ver el efecto causado, saliendo éstas negativas. Una tercera hipótesis de lo observado sería un mal manejo de los animales, lo cual es poco probable debido a la supervivencia de los testigos.

La inoculación de 60 μg de nucleocápside produjo diferentes efectos en las líneas de ratones utilizadas. En el caso de la BALB/c sólo estimuló el crecimiento en longitud; en la C3H indujo un aumento de peso y longitud en una de las camadas mientras en las otras dos lo hizo en sólo uno de los parámetros y en la C57BL/6 produjo un aumento en ambos parámetros

estadísticamente significativos. Estos resultados revelan una base genética que determina la respuesta a la proteína N.

Tanto en el caso de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida como en el de la nucleocápside purificada, existen varias posibilidades que pueden explicar la actuación de la proteína N.

3.1. Actividad análoga a la hormona del crecimiento o a la hormona liberadora de la hormona del crecimiento.

La proteína N podría unirse a los receptores de la hormona del crecimiento en las células del cuerpo, por ejemplo, en el hígado este proceso induciría a los hepatocitos a producir factores de crecimiento tipo insulina, que son los mediadores de la somatotropina (Ganong, 1988; Guyton, 1986, Lowe, 1996).

Si la proteína N se uniera a los receptores de la hormona liberadora de hormona del crecimiento en las células pituitarias, esto provocaría que estas células produjeran una mayor cantidad de somatotropina que posteriormente sería secretada a la circulación.

Esta explicación es poco probable debido a que no se encontró homología entre las secuencias de aminoácidos de las 2 hormonas mencionadas y la proteína N del virus de la rabia, lo que hace suponer que ésta no comparte la estructura conformacional con las hormonas.

3.2. Función de transducción por su homología con cinasas.

Se realizó una búsqueda por *Internet* en las bases de datos *Swiss-Prot Bank* y *GenBank* ("*EPFL, BLAST network service*"). Se encontró un 55% de homología entre las secuencias de la proteína N del virus de la rabia y serin/treonin-cinasas de varias especies (ratón, rata, conejo, humano y

bovino). Los segmentos con los que alínean corresponden al sitio activo de las mismas, según las descripciones realizadas por Altomare D.A. *et al* (1995), Rose-John S. *et al* (1988) y Osada S. *et al* (1992). Estas enzimas son transductores intracelulares cuya función es la de llevar un mensaje desde el receptor activado por la hormona hacia el núcleo para que comience un nuevo ciclo multiplicativo (Saltiel A.R., 1995; Lewin B., 1995). Esta homología, aunada al hecho de que la proteína N tenga la función de regular el paso de la transcripción a la replicación del virus (Patton *et al*, 1984) y que sea una fosfoproteína (Sokol *et al*, 1969), permiten deducir que es posible que tenga la actividad de una serina/treonina-cinasa.

3.2.1. A nivel hipófisis e hipotálamo.

Es probable que la proteína N estimule directa o indirectamente, o de ambas formas, la secreción de hormona del crecimiento (se realizó un estudio para verificar si la nucleocápside por si sola podía penetrar células de fibroblastos, se detectó en una ocasión su presencia dentro de las células; datos no mostrados). En forma directa las células de la pituitaria podrían haber sido estimuladas mediante transducción (por la proteína N) a secretar hormona del crecimiento. Indirectamente el aumento en la concentración circulante de somatotropina pudo haber sido inducido por la activación de las células hipofisarias, productoras de hormona liberadora de hormona del crecimiento. Otra posibilidad es que se presentaran ambos fenómenos.

3.2.2. En otros tejidos.

En trabajos realizados con hormona del crecimiento humana, porcina o bovina en ratones enanos (Wallis & Dew, 1973; Pidduck & Falconer, 1978;

van Buul & Van den Brande, 1978), deficientes en esta hormona y prolactina, se observó que la inoculación de 15 a 700 μg /semana, por vía subcutánea o intraperitoneal, en 3 a 7 inyecciones produce un aumento medible en el crecimiento en 1 a 3 semanas. Esto contrasta con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que en el caso de las líneas C3H y C57BL/6, las diferencias en peso y longitud eran evidentes desde el tercer o primer día post-inoculación, respectivamente.

Esto podría ser indicativo de que existe una estimulación no sólo sobre la secreción de somatotropina sino también de otros factores involucrados en el crecimiento que aceleran la respuesta; o que actuara como transductor celular (serina/treonina cinasa) en varios tipos celulares dando como resultado un aceleramiento del crecimiento. Sin embargo, esta regulación positiva de la multiplicación celular debió cesar en algún momento, tal vez dentro de los 21 días de observación, debido a que aunque se conservaron por periodo de un año algunos de los ratones utilizados, ninguno de ellos mostró la formación de tumores. La presencia de tumores podría haber sido consecuencia de que las células continuaran su multiplicación sin ningún tipo de regulación.

En el remoto caso de que la proteína N entrara de alguna forma a todo tipo de células y realizara funciones de transductor celular, mantendría "encendida" la red de señales y las células se multiplicarían constantemente. Como resultado, se observaría un crecimiento acelerado. Esto se compararía a la actividad de los retrovirus clase III (oncogénesis)².

² Transductores intracelulares, oncogenes que codifican para tirosina cinasa viral que es esencial para conservar la transformación de las células.

3.3. Estabilización de la hormona del crecimiento.

La proteína N de la nucleocápside del virus rábico puede actuar también como proteína estabilizadora de la hormona del crecimiento. Se ha observado en la enfermedad de Laron³ que la proteína estabilizadora de hormona del crecimiento se encuentra ausente, en bajas concentraciones o en forma disfuncional, siendo ésta con la ausencia de receptores para la somatotropina los causantes del retraso en el crecimiento que presentan los enfermos (Zhou *et al*, 1997). La proteína N tal vez realice la función de esta proteína, protegiendo a la hormona del crecimiento de la degradación y permitiendo así que su efecto sea más prolongado que normalmente es de 20 a 30 minutos en el humano (Ganong, 1988).

3.4. Interacción entre proteínas virales, citocinas y hormonas.

Se ha descrito una relación entre la hormona del crecimiento y el sistema inmunológico. Al haber una disminución de la hormona del crecimiento disminuye la respuesta inmune (Murphy M.J. y col., 1992).

Recientemente se describió la IL-17 (Yao Z. *et al*, 1995). Se encontró que esta nueva citocina tiene un 57% de homología con el décimo-tercer ORF del *Herpesvirus saimiri* que codifica glucoproteínas secretoras. Se confirmó que éstas tienen actividades tipo citocina como activación de NF- κ B, inducción de la secreción de IL-6 en fibroblastos y coestimulación en la proliferación de linfocitos T.

De forma similar, es factible que otra proteína viral, la proteína N del virus de la rabia, tenga actividades tipo citocina. Sin embargo, la búsqueda

³ Enfermedad hereditaria que produce enanismo en el humano y es consecuencia de defectos en el gen que codifica para los receptores de la hormona del crecimiento. Los enfermos presentan hipoglucemia, baja concentración de factor de crecimiento tipo insulina-1, altas concentraciones de hormona del crecimiento, ausencia, baja concentración o disfuncional proteína estabilizadora de somatotropina y resistencia a la hormona del crecimiento (Zhou *et al*, 1997).

en los bancos de datos no reveló homología con ninguna citocina descrita hasta el presente.

El sarcoma de Kaposi es la neoplasia más abundante en pacientes con SIDA. En la proliferación de estas células tumorales están involucradas citocinas producidas en respuesta a la presencia de glucoproteínas de membrana del virus, gp120 y gp160 (Liu *et al*, 1992), factores de crecimiento peptídicos, proteína Tat del VIH y productos de genes de herpesvirus asociados al sarcoma de Kaposi. La elevación en los niveles de citocinas de la inflamación como IL-1, oncostatina y factor de necrosis tumoral- α , inducen la producción de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), que a su vez estimula el crecimiento de las células epiteliales. Las citocinas parecen activar a las células del sarcoma de Kaposi y endoteliales a producir el bFGF de forma MAP-dependiente (Faris *et al*, 1998).

En otras enfermedades como la glomerulonefritis autoinmune y posiblemente también la nefropatía diabética (Francki *et al*, 1995), se ha descrito que la estimulación con IL-1 β , factor de crecimiento de las plaquetas o lipopolisacáridos, predispone a células renales a aumentar su tasa de multiplicación debida a la presencia de bFGF en su membrana al ser activadas por IL-1 α , IL-6 o bFGF. Por otra parte se ha visto que las α -quimocinas, como la IL-8, estimulan la proliferación y movilización de células no hemotopoyéticas como queratinocitos, músculo liso, endoteliales, fibroblastos sinoviales y melanocitos (Kemeny M.G. *et al*, 1992; SzeKanecz Z. *et al*, 1994; Nanney *et al*, 1995; Yue T.L. *et al*, 1994). La IL-8 en los queratinocitos humanos es regulada por la proteína cinasa C (Chabot-Fletcher *et al*, 1994).

La proteína N del virus de la rabia podría estimular el crecimiento de los individuos através de la inmunorregulación. Esto se observaría al estimular

la producción de IL-1 α y β , IL-6, IL-8, entre otras citocinas que a su vez aumentarían la producción de hormonas como el factor de crecimiento de las plaquetas y el bFGF, como parte de la respuesta inmune presentada frente a la presencia de la proteína N. La vacuna Fuenzalida por la presencia de fenol y su alto contenido de proteína, pudo además inducir inflamación. En ambos casos, las quimocinas pudieron promover la proliferación de queratinocitos, células musculares y endoteliales. Esto explicaría el engrosamiento de la piel observado en animales inoculados con NC o vacuna y probablemente también la aparición prematura de pelo.

Por otra parte la proteína N, al estimular la producción de hormona del crecimiento, favorecería la respuesta inmune a ella misma. En consecuencia, se secretaría una mayor cantidad de citocinas, que a su vez estimularían a algunas células a producir factores de crecimiento.

Se ha descrito la relación existente entre el sistema inmune y el cerebro. A nivel hipotálamo se ha comprobado que se produce factor liberador de corticotropina (CRF) en respuesta al estrés y a citocinas como la IL-1, la IL-6 y al TNF- α . Es posible que la reacción inmunológica frente a la proteína N, a las contenidas en la vacuna o su combinación, podría haber estimulado la producción de CRF. En este caso se podría haber inducido a nivel hipófisis que el precursor de la corticotropina (ACTH), proopiomelanocortina, fuera cortado en tres: hormona α -estimulante de melanocitos, ACTH y β -endorfina (Black, 1995). Esto podría explicar también la coloración más oscura de la piel de los ratones inoculados con NC.

4. ASPECTOS BIOQUÍMICOS.

No se localizaron reactivos capaces de medir hormona de crecimiento de ratón, por lo que para interpretar las causas de pérdida o aumento de peso y longitud en los animales se midieron las concentraciones de proteína total, glucosa y ácidos grasos libres en suero. La selección de estos parámetros se basó en el hecho de que son directamente afectados por el nivel de somatotropina circulante.

4.1. Proteína total.

4.1.1. En animales rabiosos.

Los análisis mostraron una elevación significativamente mayor ($p < 0.05$) en la concentración de proteína en sueros de ratones inoculados con el virus en relación a la de los testigos y al valor promedio encontrado en la bibliografía (5.5 mg/ml; Crispens, 1975). Un dato curioso fueron los adultos C3H que, aunque mostraron un aumento en la concentración de proteína total con respecto a sus testigos, estuvieron ambos por debajo de 5.5 mg/ml.

Garlick *et al* (1998) y otros investigadores describen que en el caso del SIDA, la pérdida de peso se da por la disminución en la síntesis proteica, la degradación de proteína y el bloqueo de receptores de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento. La acción conjunta de estos factores provocaría una disminución en la concentración y estimulación por parte de la hormona del crecimiento. En la rabia, al parecer no ocurre lo mismo, ya que se observa una elevación en la concentración de proteína en suero. Esta no puede provenir de la lisis de las células, debido a que el virus de la rabia no es lítico (Tsiang, 1993), así que puede ser proteína sintetizada en las células y liberada al torrente sanguíneo sin que se esté incorporando a sus células blanco o almacenando en las propias células productoras.

4.1.2. En animales inoculados con proteína N.

En el caso de los animales de las tres líneas inoculados con vacuna antirábica tipo Fuenzalida y nucleocápside no se detectaron diferencias significativas en la concentración total de proteína.

La albúmina tiene un papel importante en el transporte de diversas sustancias, muchas de las cuales son hidrofóbicas. Entre estas moléculas se encuentran los ácidos grasos libres y hormonas liposolubles que se unen estrechamente a ella (White *et al*, 1982).

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de proteína, albúmina y prealbúmina en sueros de niños con SIDA con y sin retraso en el crecimiento y niños no infectados (Henderson y col., 1997). Sin embargo, en los sueros trabajados en esta investigación se observó una elevación en la fracción albúmina de los ratones inoculados con virus de la rabia.

En el caso de los ratones inoculados con vacuna y nucleocápside se detectó también un aumento en la concentración de la fracción albúmina sin que se detectara una elevación en la concentración total de proteína. En este caso el aumento en la concentración de albúmina puede estar relacionado con el transporte de ácidos grasos utilizados en la producción de energía, que permite el aceleramiento del crecimiento de los ratones inducido por una elevación en la concentración de somatotropina circulante.

4.2. Glucosa.

4.2.1. En animales rabiosos.

Las concentraciones de glucosa detectadas en los sueros de los ratones con rabia fue superior al valor normal especificado en la bibliografía (70 mg/100ml de muestra; Crispens, 1975), y significativamente mayor al de los testigos. La glucemia que se presentó pudo haber sido inducida por una

disminución en la concentración de insulina circulante, provocada asimismo por la disminución en la producción de hormona del crecimiento (White *et al.*, 1982; Voet D. y J.G. Voet, 1990). Otro efecto de la falta de la hormona del crecimiento es que al no ser utilizada la glucosa como fuente energética es almacenada como glucógeno en las células, hasta saturarse y entonces es eliminada a torrente sanguíneo y posteriormente en orina. A esto se le conoce como efecto diabetógeno de la hormona de crecimiento. Un efecto más es el almacenamiento de proteína, la cual se elimina una vez que la célula está saturada (Ganong, 1988; Guyton, 1986).

4.2.2. En animales inoculados con proteína N.

En los ratones inoculados tanto con vacuna antirrábica tipo Fuenzalida como con nucleocápside no se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa al compararlas con las de sus respectivos testigos. Los valores de los sueros fueron superiores a 70 mg/100 ml, pero sin alcanzar los obtenidos en los animales inoculados con el virus de la rabia.

4.3. Ácidos grasos.

4.3.1. En animales rabiosos.

La somatotropina induce la utilización de ácidos grasos en lugar de glucosa como fuente energética, lo cual implica una movilización de los mismos en el torrente sanguíneo (Ganong, 1988; Guyton, 1986). Sin embargo, se ha visto que al inocular repetidamente somatotropina a animales en crecimiento, la hormona tiene un efecto menor en dicha movilización cuando los animales disponen de alimento *ad libitum*. En caso de que haya una restricción del mismo, la somatotropina puede provocar que se movilicen las reservas de grasa (Harris *et al.*, 1993). Los sueros de los ratones

de todos los tratamientos y líneas genéticas no mostraron diferencias significativas en cuanto a la concentración total de ácidos grasos libres.

4.3.2. En animales inoculados con proteína N.

No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de los animales inoculados con vacuna antirrábica y nucleocápside, aun cuando se esperaba observar una mayor concentración de ácidos grasos en éstos en relación a los testigos. Sin embargo, los niveles altos y estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en albúmina, sugieren que una parte de los ácidos grasos presentes pudieron haber estado unidos a esta proteína. El método colorimétrico utilizado detecta exclusivamente ácidos grasos libres, por lo cual es probable que no se haya cuantificado la totalidad de los ácidos grasos presentes en las muestras.

5. INFLUENCIA GENÉTICA SOBRE LA RESPUESTA

Existieron diferencias marcadas en la respuesta de cada una de las líneas de ratones utilizadas. Esto indica que las características genéticas de cada uno de ellos influenció la respuesta de los animales a los diferentes tratamientos. La línea C57BL/6 fue la más sensible o reactiva, siguiéndole la C3H y por último la BALB/c. Esto sugiere una investigación más profunda a fin de conocer cuáles son los factores genéticos que influyen en la respuesta observada.

CONCLUSIONES

PATOGENIA DE LA RABIA

1. La replicación del virus en el sistema nervioso central (hipotálamo e hipófisis) puede que produzca la emaciación observada en los animales con rabia, debido a una disminución en la producción de hormona liberadora de hormona del crecimiento u hormona del crecimiento o ambas. La disminución en las concentraciones de uno o ambos factores inducen cambios bioquímicos como la disminución en la producción de insulina, que obstruye la incorporación de glucosa por parte de las células y limita sus fuentes energéticas a la descomposición de la proteína celular. Esto coincide con la glucemia y los altos niveles de proteína observados con los animales con rabia.
2. La pérdida de peso ha sido informada consistentemente en animales enfermos de rabia; sin embargo, no se ha descrito el efecto en la longitud, determinado por el crecimiento óseo. Los resultados obtenidos en esta investigación revelan que los animales inoculados con el virus rábico son de menor tamaño que los testigos, seguramente a consecuencia de un retardo en el desarrollo de los huesos.

LA NUCLEOCÁPSIDE DEL VIRUS DE LA RABIA PROMUEVE EL CRECIMIENTO.

La nucleocápside del virus rábico al encontrarse en una localización atípica induce un aumento en la tasa de crecimiento, inexplicable como parte de la patogenia de la rabia. Entonces, la proteína N no puede tener la función de promover el crecimiento del animal infectado. Lo más probable es que esta proteína esté actuando por analogía con alguna proteína del hospedero (mimetismo molecular). Algunas proteínas que puede estar imitando son:

1. Somatotropina o su hormona liberadora. Se podría suponer una analogía de la proteína N con una de las hormonas ya mencionadas; sin embargo, la búsqueda realizada no mostró homologías entre estas proteínas.
2. Cinasas. La proteína N del virus de la rabia tiene un 55% de homología con los sitios activos de serina/treonina cinasas de ratón, conejo, humano y bovino.
3. Mensajero intracelular en células de la hipófisis o hipotálamo o ambas. La nucleocápside podría actuar como transductor tipo serina/treonina-cinasa, aumentando la producción de hormona liberadora de hormona del crecimiento o somatotropina o ambas, con la consiguiente estimulación del crecimiento.
4. Proteína estabilizadora de la hormona del crecimiento. Una de las funciones de la proteína N en el virus de la rabia es la de proteger al ácido nucleico y la de asociarse en un complejo con la proteína NS para llevar a cabo la replicación del virus. Esto permite pensar que podría unirse a la hormona del crecimiento, estabilizarla y protegerla de la degradación, con lo cual su vida media, que en el humano es de unos 20 minutos, se vería aumentada.
5. Transductor en células de otros tejidos. La respuesta observada fue muy temprana (comparada con lo reportado por Wallis & Dew, 1973; Pidduck & Falconer, 1978 y van Buul & Van den Brande, 1978); en el caso de la vacuna se observó el engrosamiento de la piel y presencia de pelo al 4º día de edad. Con esto se puede concluir que no sólo están involucradas la hormona del crecimiento y su hormona liberadora, sino también otros factores, como los epidérmicos.

6. Una nueva citocina. Los resultados y el análisis de la bibliografía sugieren la posibilidad de que la proteína N esté actuando como un mediador molecular del crecimiento.

FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA A LA PROTEÍNA N

El desarrollo de los animales inoculados con la proteína N es influenciado por factores que dependen tanto del animal como del inóculo:

- ◆ Edad. Resultados preliminares revelaron que los ratones inoculados desde el día de nacimiento respondieron a la vacuna antirrábica, mientras que a los de 3 días de edad no mostraron ningún efecto. Esto indica que la edad es un factor predisponente sobre la respuesta a la inoculación de nucleocápside del virus de la rabia.
- ◆ Sexo. Los resultados a este respecto no fueron concluyentes.
- ◆ Respuesta de las líneas de ratones utilizadas. Se observaron diferencias entre las respuestas de las tres líneas utilizadas. La que mostró efectos más sorprendentes fue la C57BL/6, seguida por la C3H y por último la BALB/c. Esto sugiere que las características genéticas de cada una de ellas influencia de manera distinta la respuesta frente a la inoculación de nucleocápside del virus rábico.
- ◆ Dosis. Se inocularon preparaciones de nucleocápside con dos dosis distintas (0.5 y 1.5 mg/ml). La primera dosis sólo se inoculó en ratones lactantes BALB/c, en lo que se observó emaciación y muerte, semejantes a lo observado en animales inoculados con rabia. Al aumentar la dosis, el efecto fue contrario. Por lo tanto, la respuesta es dosis dependiente.

INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS SOBRE LA PATOGENIA DE LA RABIA A DIFERENTES EDADES

En los animales inoculados con rabia se observó que los ratones lactantes machos BALB/c son más sensibles que las hembras, mientras que en los C3H se manifiesta lo contrario. Los ratones adultos BALB/c machos son más resistentes que las hembras, y se observa lo contrario en los C3H. En los C57BL/6 tanto lactantes como adultos no se detectaron diferencias significativas.

PROPUESTAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

- ◆ Estudios sobre el crecimiento de los huesos, incluyendo medición en longitud e histología de estos.
- ◆ La posible actividad de la proteína N como mensajero intracelular debe evaluarse más profundamente, iniciando por estudios que revelen si la proteína puede entrar a las células, como lo hace y en que tipos celulares.
- ◆ Algunas maneras de confirmar que en efecto la respuesta observada se debe a la sustitución de hormonas pituitarias, su estimulación o estabilización por la proteína N del virus rábico, serían:
 - a) Inocular proteína N en ratones que no producen hormona del crecimiento como el ratón pequeño (lit/lit)(Donahue & Beamer, 1993).
 - b) Inocular proteína N en ratones que producen bajas concentraciones de hormona del crecimiento, como el Snell-Bagg (DW/J) o el ratón enano de Ames (Dumont et al, 1979; Duquesnoy et al, 1972; 1981).
 - c) Inocular proteína N en ratones que producen hormona del crecimiento pero carecen de receptores para la misma y de proteína estabilizadora de ésta, como el ratón Laron (Zhou et al, 1997). Este grupo de investigadores desarrolló también un ratón deficiente sólo en la proteína estabilizadora de la hormona del crecimiento.

- ◆ Para comprobar que en efecto la nucleocápside presente en la vacuna era la causante del crecimiento en los ratones, se sugiere utilizar suspensión de cerebro normal adicionada con nucleocápside purificada. Esta mezcla tendría que tener el mismo efecto en los ratones que la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida.
- ◆ Como se conoce la secuencia de la proteína N del virus de la rabia, el siguiente paso a seguir sería hacer una sonda molecular y buscar el gen del mediador natural involucrado en el crecimiento.
- ◆ Al ser la edad un factor predisponente de la respuesta se sugiere realizar la inoculación de proteína N en ratones adultos.
- ◆ Durante esta investigación se observó que la respuesta era dosis dependiente por lo que sería conveniente investigar el efecto de diferentes dosis tanto *in vivo* como *in vitro*, para corroborar los resultados obtenidos y verificar si se presenta un fenómeno semejante al descrito por McCormack et al, 1993 para el superantígeno endógeno del virus del tumor mamario del ratón.
- ◆ Sería conveniente investigar las características genéticas que influyen en la respuesta por línea, camada e individualmente.
- ◆ Analizar el efecto de la inoculación de nucleocápside del virus de la rabia en otras especies.

APÉNDICE A: TABLAS Y GRÁFICAS DE RESULTADOS

I. RESULTADOS DE PESO Y LONGITUD:

1. Ratones BALB/c.

Tabla 1.		Ratones BALB/c	
Grupo	Parámetro	Comparación entre tratamientos	
Lactantes n=40	Peso	FC-SCN*	p<0.004
	Longitud	FC-SCN*	p<0.005
Lactantes♦ n=20	Peso	NC-PBS*	p<0.0001
	Longitud	NC-PBS*	p<0.0002
Lactantes n=12	Peso	NC-PBS	p<0.6157
	Longitud	NC-PBS*	p<0.0061
Lactantes n=13	Peso	CVS-PBS*	p<0.0104
	Longitud	CVS-PBS*	p<0.0482
Adultos n=12	Peso	CVS-PBS*	p<0.0257
	Longitud	CVS-PBS*	p<0.0336

FC= Vacuna antirrábica tipo Fuenzalida para uso veterinario; SCN= Suspensión de cerebro normal; NC= Nucleocápside del virus rábico cepa CVS-11 (60 µg/0.04 ml); PBS= Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4

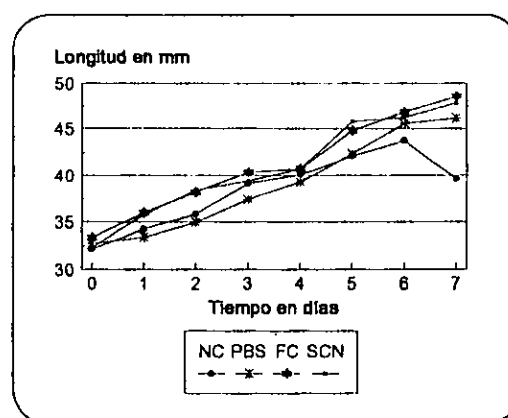
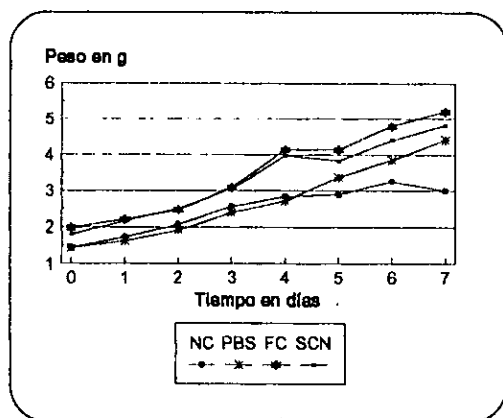
* Diferencia estadísticamente significativa p<0.05.

♦ Grupo inoculado con 20 µg de NC en lugar de 60 µg/0.04 ml.

Fig. 6. Resultados de las camadas 1,2, 3, 6 y 7 inoculadas con 20 µg/0.04 ml de nucleocápside (NC), solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS), vacuna antirrábica tipo Fuenzalida (FC) o suspensión de cerebro normal (SCN). a) Curva de crecimiento referente a peso. b) Curva de crecimiento para longitud.

a)

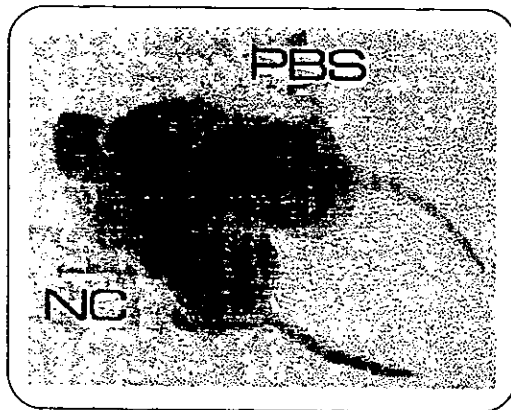
b)



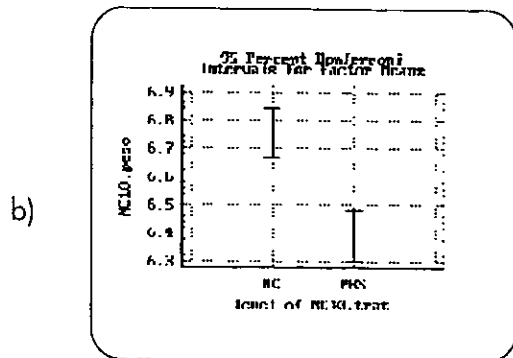
2. Ratones C3H.

Tabla 2.		Ratones C3H	
Grupo	Parámetro	Comparación entre tratamientos	
Lactantes n=5	Peso	FC-SCN*	p<0.00001
	Longitud	FC-SCN*	p<0.00120
Lactantes n=5	Peso	NC-PBS*	p<0.0002
	Longitud	NC-PBS*	p<0.0109
Lactantes n=6	Peso	NC-PBS*	p<0.0043
	Longitud	NC-PBS	p<0.2527
Lactantes n=5	Peso	NC-PBS	p<0.2806
	Longitud	NC-PBS*	p<0.0490
Lactantes n=11	Peso	CVS-PBS*	p<0.0394
	Longitud	CVS-PBS*	p<0.0181
Adultos n=8	Peso	CVS-PBS*	p<0.0237
	Longitud	CVS-PBS*	p<0.0037

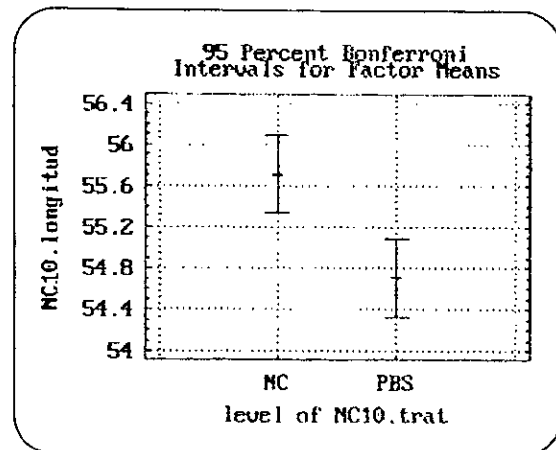
FC= Vacuna antirrábica tipo Fuenzalida para uso veterinario; SCN= Suspensión de cerebro normal; NC= Nucleocápside del virus rábico cepa CVS-11 (60 µg/0.04 ml); PBS= Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4. * Diferencia estadísticamente significativa p<0.05.



a) Fig. 7. Resultados de la camada 10, ratones lactantes C3H inoculados con 60 µg/0.04 ml. a) Ratones de 4 días de edad. b) Intervalos de Bonferroni p<0.05 para peso. c) Intervalos de Bonferroni p<0.05 para longitud.



c)



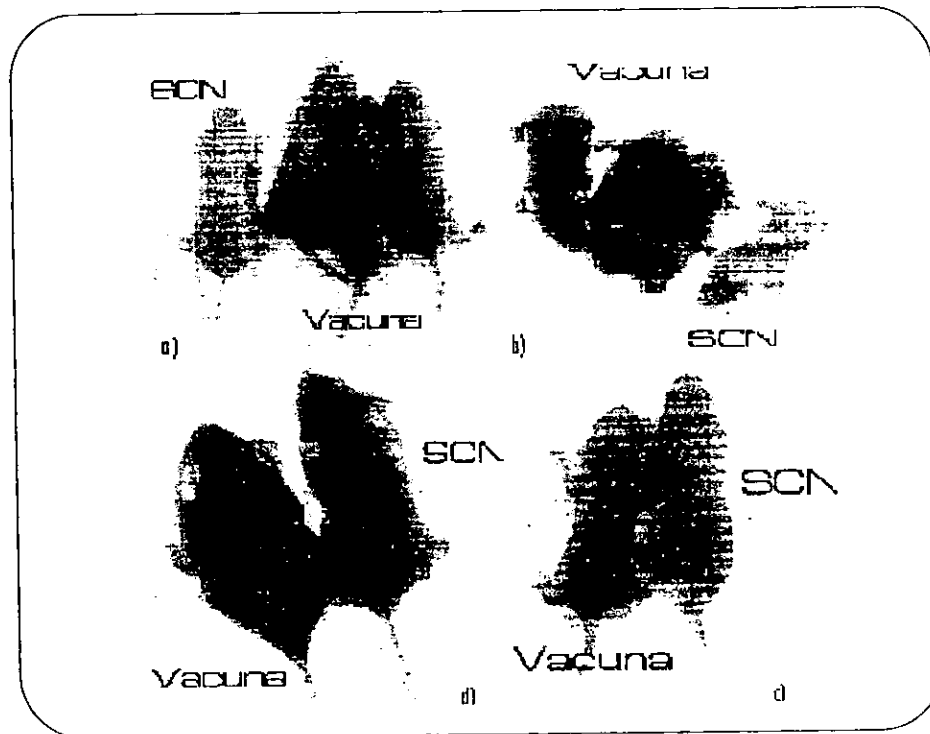
3. Ratones C57 BL/6.

Tabla 3. Ratones C57 BL/6			
Grupo	Parámetro	Comparación entre tratamientos	
Lactantes n=19	Peso	FC-SCN*	p<0.0010
	Longitud	FC-SCN*	p<0.0011
Lactantes n=11	Peso	NC-PBS	p<0.0001
	Longitud	NC-PBS*	p<0.0001
Lactantes n=8	Peso	CVS-PBS*	p<0.0394
	Longitud	CVS-PBS*	p<0.0079
Adultos n=8	Peso	CVS-PBS*	p<0.0056
	Longitud	CVS-PBS*	p<0.0214

FC= Vacuna antirrábica tipo Fuenzalida para uso veterinario; SCN= Suspensión de cerebro normal; NC= Nucleocápside del virus rábico cepa CVS-11 (60 µg/0.04ml); PBS= Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4

* Diferencia estadísticamente significativa p<0.05.

Fig. 8. Secuencia de fotografías que muestran el desarrollo de los ratones inoculados con vacuna o suspensión del cerebro normal a diferentes edades. a) 1 día de edad; b) 4 días de edad; c) 8 días de edad y d) 21 días de edad.



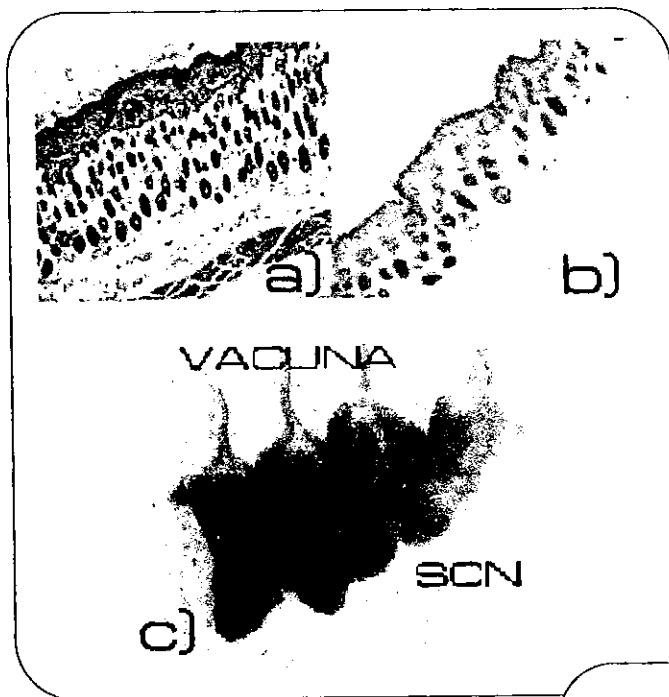
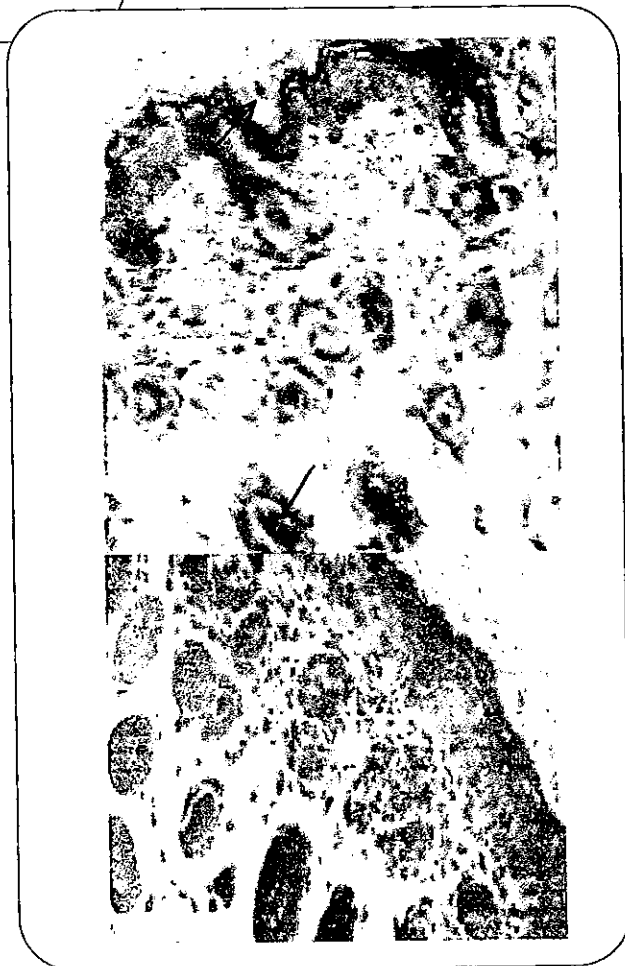


Fig 9. Cortes histológicos de piel de ratones C3H a los 4 días de edad teñidos con H&E y observados a 10x. a) Piel de un ratón inoculado con suspensión de cerebro normal (SCN); b) Piel de un ratón inoculado con vacuna antirrábica tipo Fuenzalida (FC); c) Fotografía de los ratones de donde se tomaron las muestras.

Fig 10. Fotografías de cortes histológicos que muestran un acercamiento de los mostrados en la figura anterior (40x). a) Corte de piel de un ratón inoculado con vacuna antirrábica (la flecha indica el nacimiento de pelo); b) Corte de piel de un ratón inoculado con SCN.



II. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

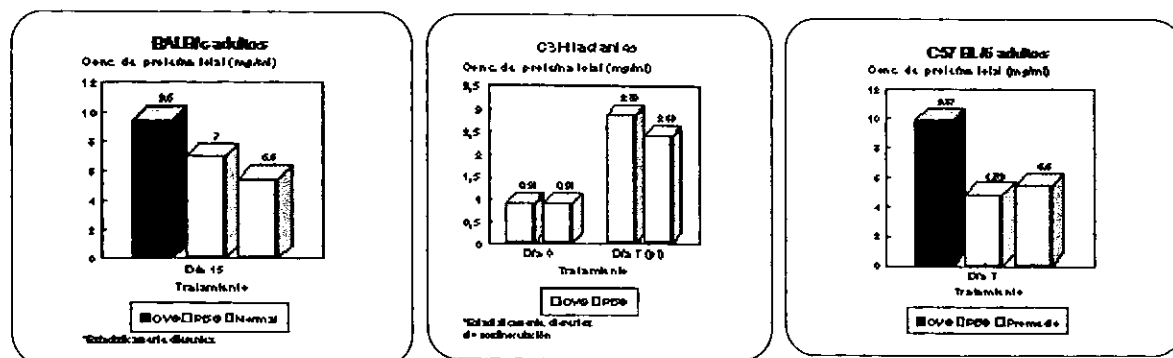
1. Proteína.

Tabla 4. Resultados estadísticos de la comparación entre los diferentes tratamientos sobre la cuantificación de proteína en los sueros de los ratones.

Grupo	Comparación entre tratamientos	
BALB/c, lactantes	FC-SCN	p<0.5789
	NC-PBS	p<0.5692
	CVS-PBS*	p<0.0243
BALB/c, adultos	CVS-PBS*	p<0.0483
C3HeB/FeJ, lactantes	FC-SCN	p<0.5263
	NC-PBS	p<0.4031
	CVS-PBS*	p<0.0196
C3HeB/FeJ, adultos	CVS-PBS*	p<0.0121
C57BL/6, lactantes	FC-SCN	p<0.8954
	NC-PBS	p<0.4031
	CVS-PBS*	p<0.0233
C57BL/6, adultos	CVS-PBS*	p<0.0083

* Diferencia significativa.

Fig. 11. Concentración de glucosa en sueros de ratones inoculados con virus (CVS-11) o PBS: a) BALB/c adultos; b) C3H lactantes; c) C57Bl/6 lactantes.

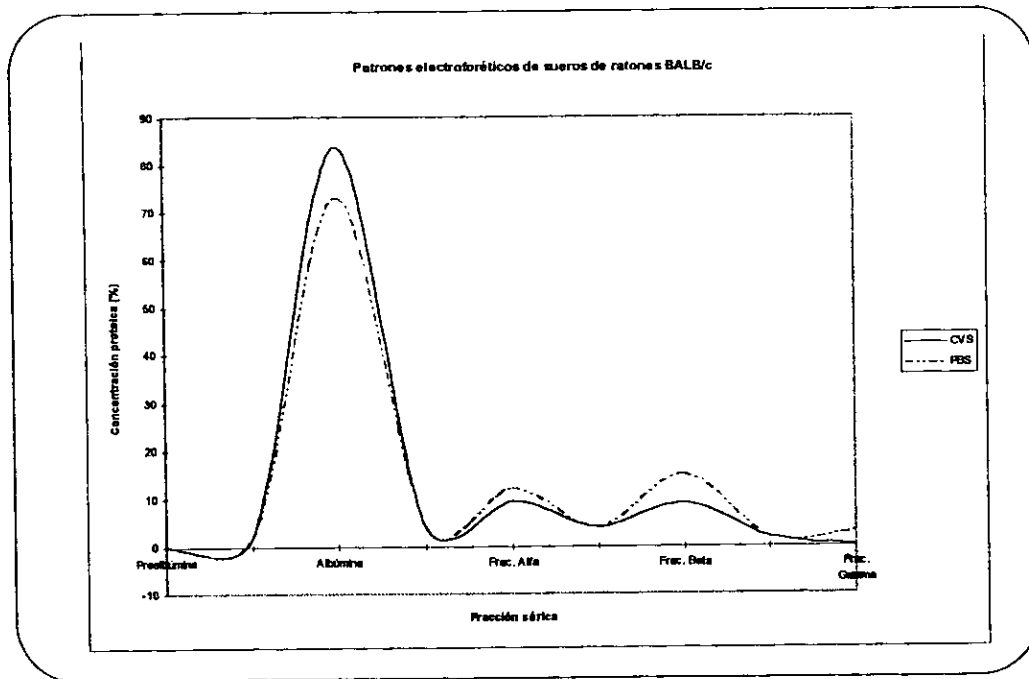


a)

b)

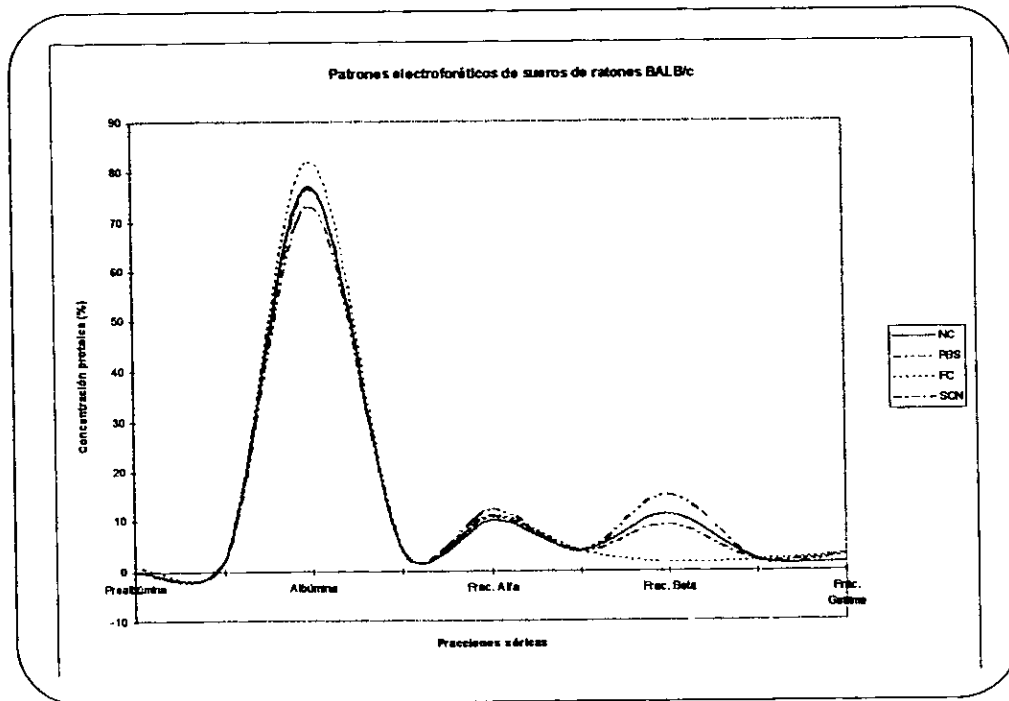
c)

Fig 12. Análisis electroforético de sueros de ratones BALB/c. a) Ratones inoculados con CVS-11 o PBS, 7 días post-infección.



*CVS-PBS

b) Sueros de ratones de 21 días de edad inoculados con vacuna antirrábica (FC), suspensión de cerebro normal (SCN), nucleocápside (NC) o PBS.



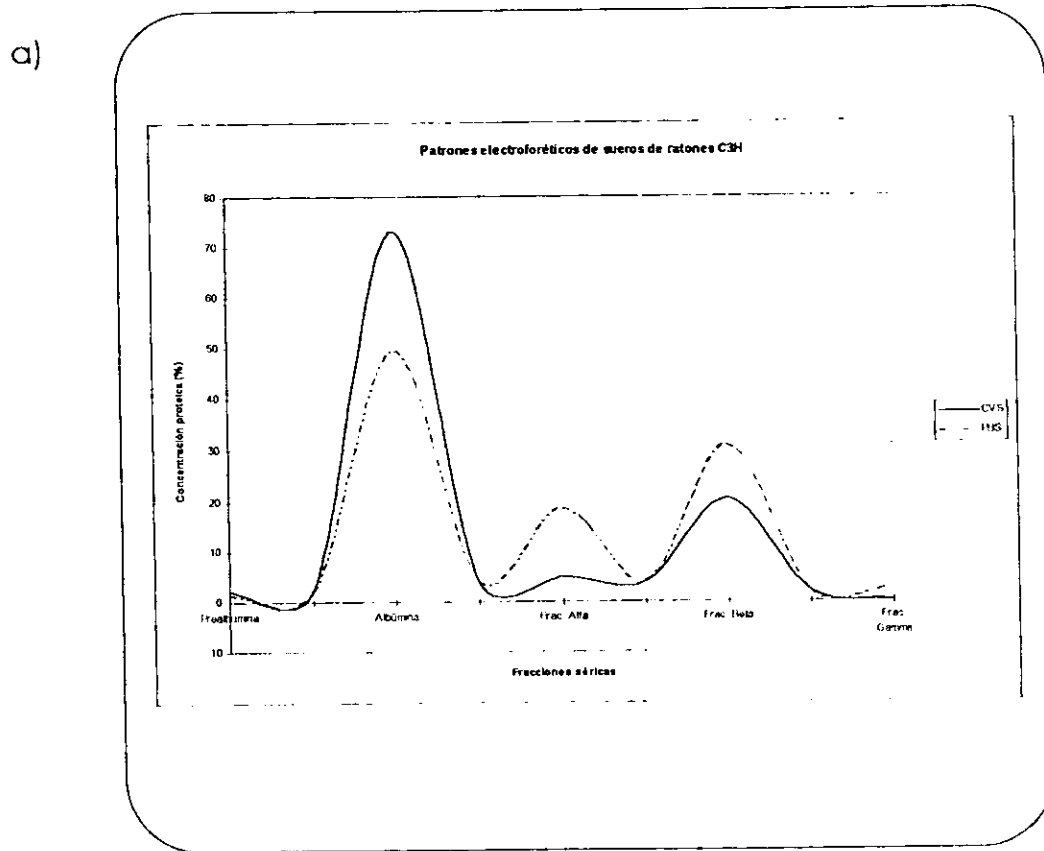
*FC-SCN
 *FC-NC
 NC-SCN
 *NC-PBS
 *PBS-SCN

c) Tabla de datos de los porcentajes de concentración proteica en los sueros analizados en las gráficas a) y b).

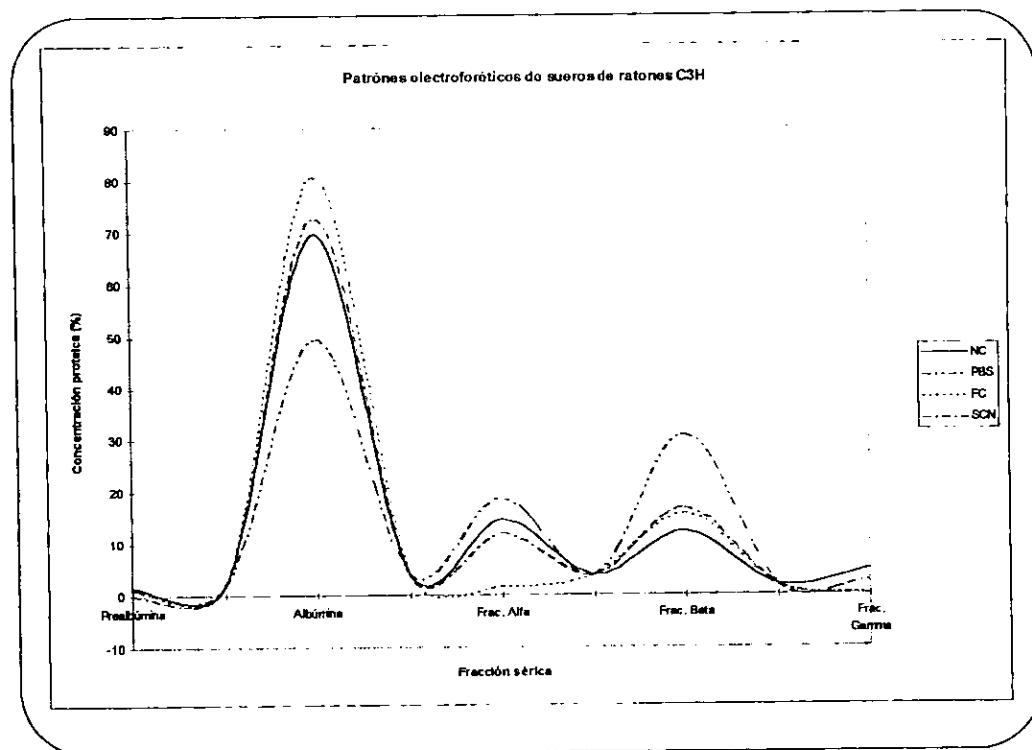
Tratamiento	Fracciones séricas				
	Prealbúmina	Albúminas (60.8-65.7 %)*	α -globulinas (12.1-14.5 %)*	β -globulinas (5.5-6.8%)*	γ -globulinas (1.3-1.5 %)*
CVS	ND	83.77	9.51	9.03	ND
PBS	ND	73.16	12.18	15.08	3.00
NC	ND	76.95	10.00	11.20	1.55
FC	0.92	82.12	11.24	1.57	3.18
SCN	ND	76.68	11.00	9.32	3.20

* Los valores entre paréntesis son los porcentajes normales encontrados en el suero.
 ND = No detectado

Fig 13. Graficas que muestran los patrones electroforéticos de sueros de ratones C3H: a) inoculados con CVS-11 o PBS, 7 días post-infección; b) inoculados con vacuna (FC), suspensión de cerebro normal (SCN), nucleocápside (NC) o PBS a los 21 días de edad.



CVS-PBS*



b)
 *FC-SCN
 *FC-NC
 *FC-PBS
 NC-SCN
 *NC-PBS
 *PBS-SCN

c) Tabla que muestra los valores graficados en a) y b).

Tratamiento	Fracciones séricas				
	Prealbúmina	Albúminas (60.8-65.7 %)*	α -globulinas (12.1-14.5 %)*	β -globulinas (5.5-6.8 %)*	γ -globulinas (1.3-1.5 %)*
CVS	2.03	73.31	4.92	20.54	ND
PBS	1.35	49.41	18.73	30.88	2.72
NC	1.45	69.8	14.64	12.15	4.87
FC	1.02	80.8	1.77	15.81	ND
SCN	ND	72.7	12.1	16.9	ND

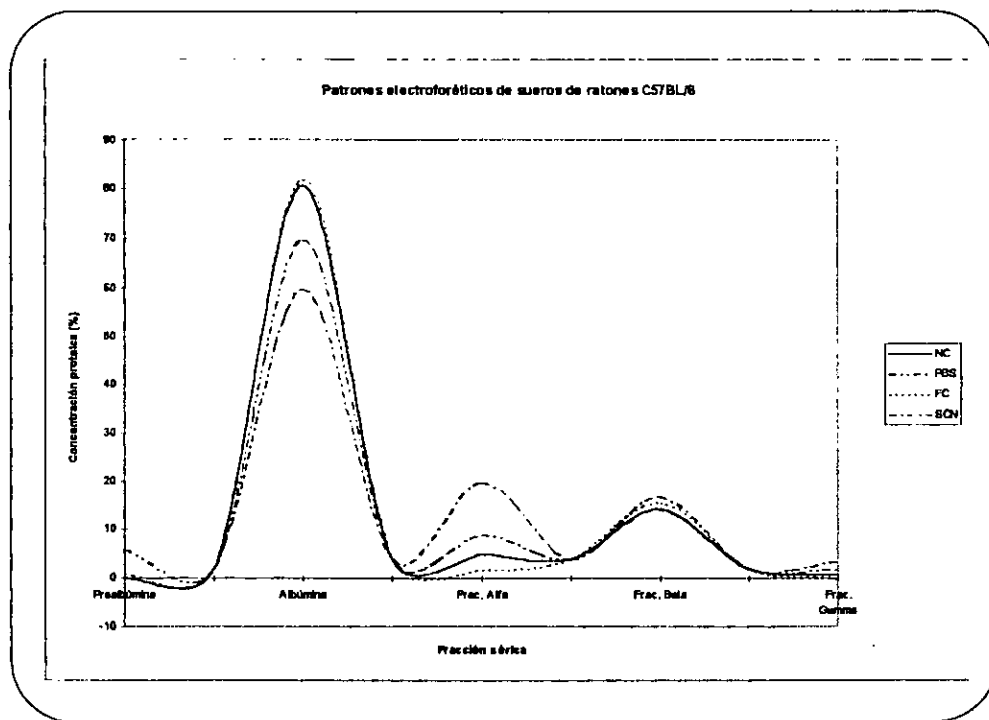
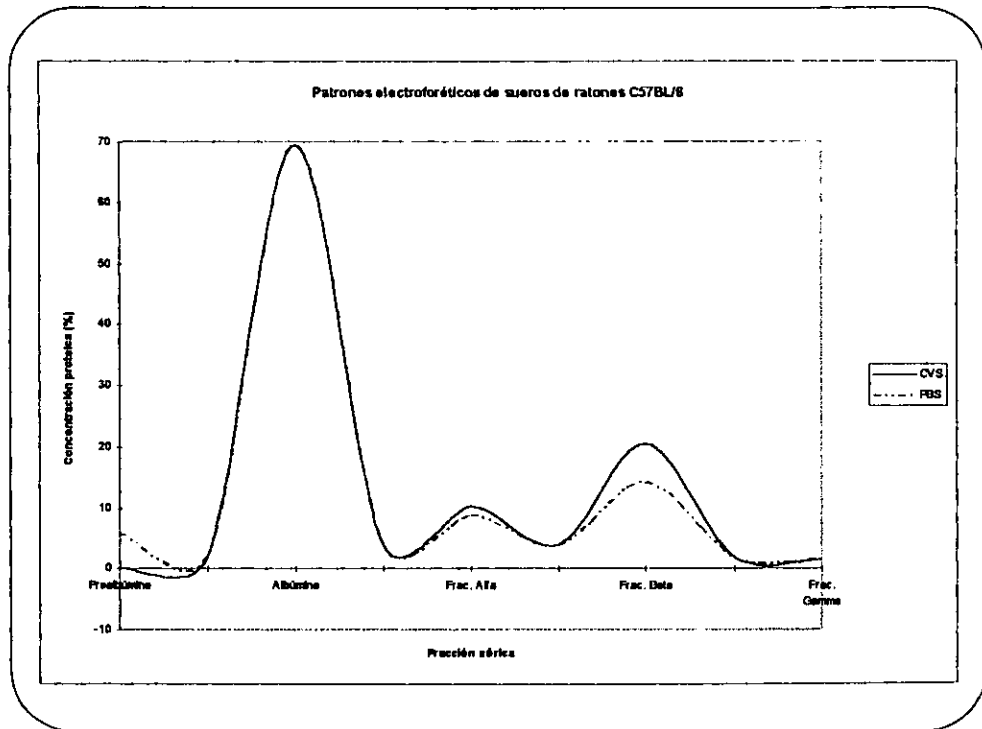
* Los valores entre paréntesis son los porcentajes normales encontrados en el suero.

ND = No detectado

Figura 14. Graficas que muestran los patrones electroforéticos de sueros de ratones C57BL/6: a) inoculados con CVS-11 o PBS, 7 días post-infección; b) inoculados con vacuna (FC), suspensión de cerebro normal (SCN), nucleocápside (NC) o PBS a los 21 días de edad.

a)

CVS-PBS*



b)

- *FC-SCN
- FC-NC
- *FC-PBS
- *NC-SCN
- *NC-PBS
- *PBS-SCN

c) Tabla de datos de las gráficas mostradas en a) y b).

Tratamiento	Fracciones séricas				
	Prealbúmina	Albúminas (60.8-65.7 %)*	α -globulinas (12.1-14.5 %)*	β -globulinas (5.5-6.8%)*	γ -globulinas (1.3-1.5 %)*
CVS	ND	69.55	10.23	20.48	1.5
PBS	5.84	69.59	8.9	14.38	1.64
NC	ND	80.73	4.73	14.39	0.69
FC	0.92	82.12	1.78	15.64	ND
SCN	ND	59.77	19.87	16.98	3.39

* Los valores entre paréntesis son los porcentajes normales encontrados en el suero.

ND = No detectado

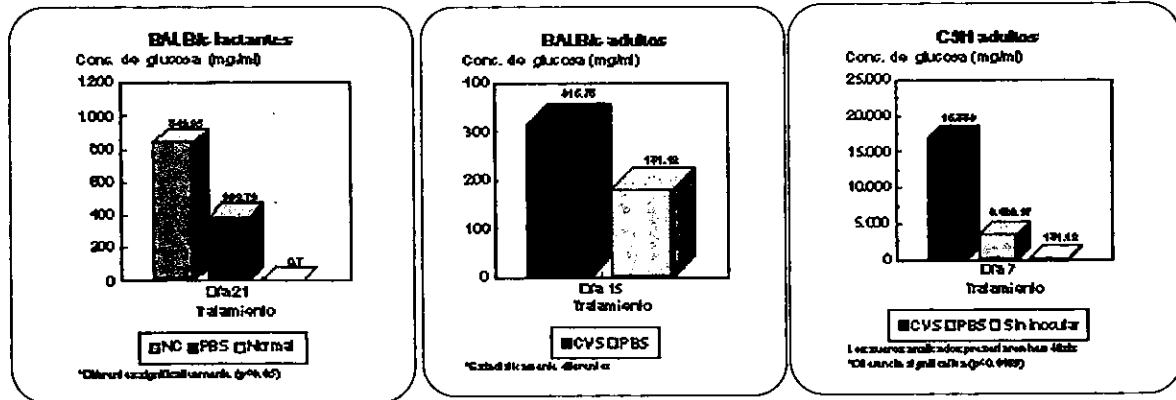
2. Glucosa.

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de glucosa en sueros.

Grupo	Comparación entre tratamientos	
BALB/c, lactantes	FC-SCN	p<0.15324
	NC-PBS*	p<0.04990
	CVS-PBS*	p<0.08152
BALB/c, adultos	CVS-PBS*	p<0.03990
C3HeB/FeJ, lactantes	FC-SCN	p<0.23628
	NC-PBS	p<0.82660
	CVS-PBS*	p<0.01723
C3HeB/FeJ, adultos	CVS-PBS*	p<0.01590
C57BL/6, lactantes	FC-SCN	p<0.58597
	NC-PBS	p<0.78150
	CVS-PBS	p<0.59470
C57BL/6, adultos	CVS-PBS	p<0.59090

*Diferencia estadística

Fig 15. Gráfica que muestra la diferencia entre los títulos de glucosa total en sueros de ratones BALB/c: a) Lactantes inoculados con 60 µg de NC o PBS, comparados con el valor bibliográfico; b) Ratones adultos inoculados con CVS o PBS; c) Ratones adultos C3H inoculados por vía intracerebral con CVS-11 o PBS.



a)

b)

c)

III. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS EXTRAÍDAS MEDIANTE EL PROGRAMA ENTREZ DE LAS BASES DE DATOS GENBANK Y SWISS PROTEIN BANK.

Fig. 16. Alineación de la proteína N del virus de la rabia con proteínas cinasas de origen de ratón (*Mus musculus*).

Proteína "N", cepa PV ¹	348	E	F	F	G	K	G	T	F	E	R	R	F	F	R	D	E	K	E	L	Q	E	Y	E	A
Proteína cinasa AKT2 ²	156	K	+	L	G	K	G	T	F	+	K	V	I	L	V	R	E	K	A	T	G	R	Y	Y	A
Proteína cinasa PKC-ALPHA ³	346	M	V	L	G	K	G	+	F	+	K	V	L	A	D	R	K	G	T	+	E	L	Y	A	
Proteína cinasa NPKC-THETA ⁴	384	K	+	L	G	K	G	+	F	+	K	V	F	L	A	E	F	K	R	T	N	+	+	F	A
Proteína "N", cepa PV	372	A	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	D	G	T	V	N	S	D	D	E	D	Y	F
Proteína cinasa AKT2	180	+	+	I	+	R	K	+	V	I	+	A	K	D	E	V	A	H	+	+	T	E	S	R	V
Proteína cinasa PKC-ALPHA	370	+	+	I	+	K	K	D	V	V	I	+	D	D											
Proteína cinasa NPKC-THETA	408	+	+	A	+	K	K	D	V	V	L	+	D	D											
Proteína "N", PV	396	S	G	E	T	R	S	P																	
Proteína cinasa AKT2	204	L	Q	N	T	R	H	P																	

¹Secuencia aminoacídica de la proteína N del virus rábico cepa PV, según descrita por Tordo N. y col., 1986; No. de registro en Swiss-Prot P06025.

²Secuencia aminoacídica de la proteína serin/treonin cinasa (timo) de *Mus musculus*, descrita por Altomare D.A. y col. en 1995; No. de registro en GenBank U22445.

³ Secuencia aminoacídica de la proteína cinasa C tipo alfa (cerebro) de *Mus musculus*, descrita por Rose-John S. y col. en 1988; No. de registro en Swiss-Prot P20444.

⁴ Secuencia aminoacídica de la proteína cinasa C tipo theta (músculo esquelético) de *Mus musculus*, descrita por Osada S. y col. en 1992; No. de registro de Swiss-Prot Q02111.

*Las letras contenidas en una caja son aminoácidos presentes en la misma posición en las cuatro proteínas analizadas.

**Las letras en negrillas indican homologías de la proteína N del virus rábico con por lo menos una de las enzimas analizadas.

APÉNDICE B: FÓRMULAS DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS

Reactivos para cultivo celular.

○ Medio mínimo esencial (MEM) 10%.

MEM (Gibco, No. catálogo 61100-053)	1 sobre
Suero fetal bovino	100 ml
L-glutamina 200 mM	10 ml
Bicarbonato de sodio 1.5%	15 ml
Penicilina G sódica	1000 000 UI
Sulfato de estreptomicina	2 g
Agua tridestilada c.b.p	1000 ml

Esterilizar por filtración, haciéndolo pasar por una membrana de 0.22 μ m. Posteriormente realizar pruebas de esterilidad para verificar la ausencia de contaminantes como bacterias y hongos.

○ Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4.

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ PO ₄	1.17 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
Agua tridestilada c.b.p.	1000ml

Esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 15 min.

○ Tripsina-verseno.

Tripsina 1:250 (Gibco, No. de Cat. 27250-042)	0.25 g
EDTA	1.50 g
PBS c.b.p.	100 ml

Esterilizar por filtración.

○ Sacarosa al 70 %.

Sacarosa	70 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Reactivos para la titulación de virus por el método de placas.

○ Medio MS

Solución de Earle sin rojo de fenol, ni bicarbonato de sodio	100 ml
Solución de amino ácidos para medio MEM, 100x	10 ml
Solución de vitaminas para medio MEM, 100x	10 ml
L-glutamina 200 mM	10 ml
Bicarbonato de sodio 5.6%	50 ml
Suero de ternera, descomplementarizado	20 ml

Esterilizar por filtración antes de utilizarse.

○ Agarosa 1%

Agarosa	1g
Agua tridestilada, c.b.p.	100 ml

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 10 lb de presión durante 10 minutos.

Al momento de utilizarse mezclar volumen a volumen la agarosa y el medio MS, agregando por cada mililitro de medio MS 20 ml de DMSO y 5 ml de dextran (10 mg/ml).

○ Solución de formaldehído

Formadehído	10 ml
PBS, c.b.p.	100 ml

○ Solución de cristal violeta

Cristal violeta	0.25 g
Etanol	25 ml
Cloruro de sodio	0.43 ml
Agua destilada	22.5 ml
Formaldehído	2.5 ml

Utilizando guantes primero disolver el cristal violeta en el etanol, y separadamente el cloruro de sodio con el agua. Una vez realizado esto se mezclan las tres soluciones.

Preparación de membranas de diálisis.

○ EDTA 150 mM

EDTA disódico (P.M. 372,24)	13.96 g
Agua destilada c.b.p.	250 ml

○ Tris 10 mM pH 7

Tris (P.M. 121.14)	1.2114 g
Agua destilada	1000 ml
Ajustar el pH a 7 con HCl 2 N.	

○ Glicerol 20 % en Tris 10 mM pH 7.

Glicerol	100 ml
Tris 10 mM pH 7 c.b.p.	500 ml

○ Solución amortiguadora NT

NaCl	29.22 g
Tris	30.25 g
Agua destilada , c.b.p.	5 l

Disolver en 4.5 litros de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con ácido acético. Aforar a 5 l.

Soluciones para la preparación de geles de poliacrilamida y reactivos para la electroforesis.

○ Solución A.

Gel Condensador	
Acrilamida (gel condensador)	40 g
Bis-acrilamida (gel condensador)	1.0 g
Agua tridestilada c.b.p.	100 ml
Gel Separador	
Acrilamida (gel separador)	100 g
Bis-acrilamida (gel separador)	2.7 g
Agua tridestilada c.b.p.	100 ml

OSolución B.		
Tris base		3.6 g
HCl 1 N		0.6 ml
EDTA 0.2 M, pH 8.0		0.53 ml
Agua tridestilada c.b.p.		10 ml
OSolución C.		
Tris base		3.7 g
HCl 5 N		0.6 ml
EDTA 0.2 M, pH 8.0		0.4 ml
Agua tridestilada c.b.p.		10 ml
OSolución D.		
SDS		1 g
Agua destilada c.b.p.		10 ml
OSolución E.		
Persulfato de amonio		0.1 g
Agua tridestilada c.b.p.		1 ml
OSolución F.		
TEMED		20 ml
Agregar directamente justo antes de usar el gel.		
OSolución G (Solución Amortiguadora de corrida)		
Tris base		3 g
Glicina		4.4 g
Solución D		10 ml
OSolución H (Solución Amortiguadora de muestra).		
Solución C		10 ml
Solución D		4 ml
Glicerol (al 50 % v/v en agua tridestilada)		2 ml
Agua tridestilada		2 ml

○Gel separador.

Solución A	11.32 ml
Solución B	6.28 ml
Solución D	0.34 ml
Solución E *	3.40 ml
Glicerol	3.08 ml
Agua tridestilada	10.00 ml
TEMED *	20 ml

* Se agregarán justo ante de vaciar. Ya solidificado se añadirán 0.5 ml de isopropanol, para nivelar el límite del gel.

○Gel concentrador.

Solución A	2.0 ml
Solución C	2.5 ml
Solución D	0.1 ml
Solución E	0.1 ml
Agua tridestilada	5.8 ml
TEMED	2.5 μ l

Una vez sellada la cámara de electroforesis con agarosa se vaciará el gel separador, se esperará a que se polimerice: entonces se vaciará el gel concentrador introduciéndose el peine. Una vez que ha gelificado se colocarán 50 ml de muestra por carril, usando como marcador de corrimiento azul de bromofenol.

Reactivos necesarios para la titulación de proteína, glucosa y ácidos grasos libres.

a. Método de Bradford.

○Reactivo de Bradford.

En un matraz volumétrico de 1 l disolver:

Azul de Coomasie G250 (Fluka No. de Cat. 607713)	100 mg
Etanol al 95 %	50 ml
Acido Fosfórico al 85 %	100 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Filtrar a través de papel Whatmann No. 1. Almacenar a 4 °C.

○ Solución Amortiguadora de NaCl 0.15 M

NaCl (P.M. 58.44)	0.44 g
Agua destilada c.b.p.	50 ml

○ Patrón de albúmina sérica bovina

Albúmina sérica bovina	1 g
Agua destilada c.b.p.	1 ml

○ Solución Amortiguadora de Veronal sódico para corrimiento de tiras de Cellogel.

Veronal sódico	8.24 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

○ Azul de Coomasie 1%

Azul de Coomasie G250 (Fluka No. de Cat. 607713)	100 mg
Agua destilada	10 ml

○ Solución deshidratadora

Metanol absoluto	20 ml
------------------	-------

○ Solución transparentadora

Metanol absoluto	21.50 ml
Glicerol	0.25 ml
Acido acético	3.50 ml

b. Método colorimétrico para la cuantificación de glucosa en suero.

○ Solución amortiguadora de cloruro de sodio monobásico 0.1 M

NaCl monobásico anhidro (P.M. 120.01)	0.65g
Agua destilada c.b.p.	500 ml

○ Solución amortiguadora de cloruro de sodio dibásico 0.1 M

NaCl dibásico heptahidratado (P.M. 268.07)	13.40 g
Agua destilada c.b.p.	500 ml

En un matraz con agitación se coloca la solución de cloruro de sodio dibásico y se le agrega poco a poco solución de cloruro de sodio monobásico hasta ajustar la mezcla a un pH de 7.0.

○ Solución stock de fenol

Fenol	4.48 mg
Agua destilada c.b.p.	100 ml

○ Solución de enzimas 2x

Glucosa oxidasa	100 mg
Peroxidasa	16 mg
Solución amortiguadora de fosfatos	10 ml
Glicerol al 85%	10 ml

○ Solución de trabajo

Aminoantipirina	18.2 mg
Solución amortiguadora de fosfatos	300 ml
Solución stock de fenol	3.75 ml
Solución de enzimas 2x	1.92 ml

En un matraz de 500 ml disolver la aminoantipirina en la solución amortiguadora de fosfatos. Una vez disuelta se adiciona el fenol y se agita. Por último se agrega la solución de enzimas 2x. Utilizar lo antes posible. Si es necesario se puede guardar a 4 °C en un recipiente oscuro.

○ Patrón de glucosa

Glucosa	1 g
Agua destilada c.b.p.	1 ml

c. Método colorimétrico para la cuantificación de ácidos grasos libres.

Se siguieron las instrucciones y utilizaron los reactivos contenidos en el "kit" comercial de Boehringer-Manheim (No. de catálogo 1383175). El único reactivo no incluido era el patrón que se preparó de la siguiente manera.

Acido palmítico	100 mg
Triton X-100 c.b.p.	10 ml

BIBLIOGRAFIA

1. Altomare D.A., Guo K., Cheng J.Q., Sonoda G., Walsh K. and Testa J.R. Cloning chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene* 1995; 11 (6): 1055-1068.
2. Astoul E., Lafage M., and M. Lafon. Rabies superantigen as a Vb T-dependant adjuvant. *J. Exp. Med.* 1996; 183:1623-1631.
3. Atanasiu P., Perrin P., Delagneau J.S. Use of an enzyme immunoassay with protein-A for rabies antigen and antibody determinations. In: *Development in Biological Standardization*. Vol. 46, 1980.
4. Black P.H. Psychoneuroimmunology: Brain and immunity. *Scientific Am. Sci. & Med.* 1995; Nov/Dec: 16-25.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
6. Chabot-Fletcher M., Breton J., Lee J., Young P., Griswold D.E. Interleukin-8 production is regulated by protein kinase C in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1994; 103:509-515.
7. Chenik M., Chebli K., Gaudin Y and D. Blondel: In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *J. gen Virol.* 1994; 75: 2889-2896.
8. Coll J.M.: The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Arch. of Virol.* 1995; 140 (5): 827-851.
9. Coulon P., Rollin P.E. and A. Flammand: Molecular basis of rabies virus virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence. *J. gen Virol.* 1983; 64: 693-696.
10. Coulon P., Derbin C., Kucera P., Lafay F., Prehaud C and A. Flammand: Invasion of the peripheral nervous system of adult mice by the CVS strain

- of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *J. Virol.* 1989; 63 (8): 3550-3554.
11. Crispens C.G. Jr. *Handbook on the laboratory mouse.* Charles C. Thomas Publisher. U.S.A. 1975.
 12. Dietzchold B., Wiktor T.J., Wunner W.H., and Varrichio A. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology* 1983; 124:330-337.
 13. Dietzschold B., Wiktor T.J., Trojanowski J.Q., MacFarlan R.I., Wunner W.H., Torres-Anjel M.J. and H. Koprowski. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *J. Virol.* 1985; 56 (1): 12-18.
 14. Dietzchold B., Lafon M., Wang H., Otvos L. Jr., Celis E., Wunner W.H. & Koprowski H.: Localization and Immunological Characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Res.* 1987a; 8:103 -125.
 15. Dietzchold B., Wang H., Rupprecht C.E., Celis E. Tollis M., Ertl H., Heber-Katz E. and Koprowski H.: Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987b; 84: 9165-9169.
 16. Dietzchold B., Gore M., Ertl H., Celis E., Otvos L. and Koprowski H.: Analysis of protective immune mechanisms induced by rabies nucleoprotein. In: *Genetics and Pathogenicity Of Negative Strand Viruses.* Editors: Mahy B.W.J. & Kolakowsky . Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York. 1989.
 17. Donahue L.R. and W.G. Beamer. Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1, or -4. *J. Endocrinol.* 1993; 136:91-104.

18. Dumont F., Robert F. and B. Bischoff. T and B lymphocytes in pituitary dwarf Snell-Bagg mice. *Immunology* 1979; 38:23-31.
19. Duquesnoy R.J. Immunodeficiency of the thymus dependent system of the Ames dwarf mouse. *J. Immunol.* 1972; 108:1578-1590.
20. Duquesnoy R.J. and G.M. Pederson. Immunologic and hematologic deficiencies of the hypopituitary dwarf mouse. In: Gershwin M.E. and B. Merchant (eds). *Immunologic defects in laboratory animals. Vol. 1.* Plenum Press, New York. 1981.
21. Eaves-Pyles T. & J.W. Alexander. The effect of blood transfusion on susceptibility to bacterial infection in genetically defined mouse models. *J. Trauma* 1997; 43 (6):894-898.
22. Faris M., Ensoli B., Kokot N. and A.E. Nel. Inflammatory cytokines induce the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) isoforms required for the growth of Kaposi's sarcoma and endothelial cells through the activation of AP-1 response elements in the bFGF promoter. *Aids* 1998;12 (1):19-27.
23. Fekadu M., Sumner J.W., Shaddock J.H., Sanderlin D.W. and G.M. Baer: Sickness and recovery of dogs challenged with a street rabies virus after vaccination with vaccinia virus recombinant expressing rabies virus N protein. *J. of Virol.* 1992; 66(5): 2601-2604.
24. Fenner F.J., Gibbs E.P.J., Murphy F.A., Rott R., Studdert M.J. and D.O. White. *Veterinary Virology. Second Edition.* Academic Press, Inc. U.S.A. 1993.
25. Foster H.L., Small J.D. and J.G. Fox. *The mouse in biomedical research. Vol. I. History, genetics, and wild mice.* Academic Press, Inc. USA. 1981.
26. Foster H.L., Small J.D. and J.G. Fox. *The mouse in biomedical research. Vol. III. Normative biology, immunology and husbandry.* Academic Press, Inc. USA. 1983.

27. Fuenzalida E. y Palacios R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirrábica. *Biol. Inst. Bact. Chile* 1955; 8:3-10.
28. Ganong W.F. (1988). *Fisiología Médica. El Manual Moderno*. México.
29. Garlick P.J., McNurlan M.A., Bark T., Lang C.H. and M.C. Gelato. Hormonal regulation of protein metabolism in relation to nutrition and disease. *J. Nutr.* 1998; 128 (2 suppl): 356S-359S.
30. Guyton A.C. *Tratado De Fisiología Médica. Séptima Edición*. Interamericana- McGraw-Hill. México. 1986.
31. Guyton A.C. *Tratado de Fisiología Médica. Sexta Edición*. Interamericana- McGraw Hill. México. 1991.
32. Harris G.W., Reed M. and C.P. Fawcett. Hypotalamic releasing factors and the control of anterior pituitary functions. *Br. Med. Bull.* 1966; 196:266-272.
33. Harris D.M., Dunshea F.R., Bauman D.E., Boyd R.D., Wang S.X., Johnson P.A. and Clarke S.D. Effect of in vivo somatotropin treatment of growing pigs on adipose tissue lipogenesis. *J. Anim. Sci.* 1993; 71(12):3293-3300.
34. Hattwick M.A.W. and Gregg M.B.: The disease in man. In: Baer G. (Ed). *The Natural History Of Rabies*. Vol. II. Academic Press.U.S.A. 1975.
35. Herzog M., Lafage M., Montañó-Hirose J.A., Fritzell C., Scott-Algara D. & Lafon M.: Nucleocapsid specific T and B cells responses in humans after rabies vaccination. *Virus Res.* 1992; 24:77-89.
36. Hummeler K., Koprowski H. and Wiktor T.J.: Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J. of Virol.* 1987; 1: 152-170.
37. Iwasaki Y., Wiktor T.J. and Kopowski H.: Earley events of rabies virus replication in tissue cultures. An electronmicrocopy estudy. *Lab. Invest.* 1973; 28:142-148.
38. Kemeny L. Ruzicka T., Dobozy A., Michel G. Role of interleukin-8 in skin (review). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994; 104:317-322.

39. Kissi B., Tordo N. and H. Bourhy. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*. 1995; 209: 526-537.
40. Lafon M.. La Nucleocapside du Virus Rabique: Une Nouvelle Cible Pour la Response Immunitaire et Pour la Therapie?. Thèse de Doctorat. Université de Paris VI. Paris, France. 1987.
41. Lafon M. and M. Lafage: Antiviral activity of monoclonal antibodies specific for the internal proteins N and NS of rabies virus. *J. Gen. Virol.* 1987; 68:3113-3123.
42. Lafon M., Lafage M., Martínez-Arends A., Ramírez R., Vuillier F., Charron D., Lotteau V. and D. Scott-Algara: Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* 1992; 358: 507-509.
43. Lafon M, Scott-Algara D., Marche P., Cazenave P.A., Jouvin-Marche E.: Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J. Exp. Med.* 1994; 180:1207-2133.
44. Lentz T.L., Burrage T.G., Smith A.L., Crick J. and Tignor G.H.: Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?. *Science* 1982; 215:182-184.
45. Lewin B. *Genes*. Oxford University Press and Cell Press. USA. 1995.
46. Liu A.Y., Miskovsky E.P., Stanhope P.E. and R.F. Siliciano. Production of transmembrane and secreted forms of tumor necrosis factor (TNF)- α by HIV-specific CD4⁺ cytolytic T lymphocyte clones. Evidence for TNF- α independent cytolytic mechanism. *J. Immunol.* 1992; 148: 3789-3798.
47. Lodmell D.L., Sumner J.W., Esposito J.J., Bellini W.J. and L.C. Ewalt: Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *J. of Virol.* 1991; 65: 6, 3400-3405.

48. Lodmell D.L., Esposito J.J. and L.C. Ewalt. Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. *J. of Virol.* 67:10, 6080-6086 (1993).
49. Lowe W.L Jr. Insulin-like growth factors. *Science and Medicine* 1996; March/April: 62-71.
50. Madore H.P. & J.M. England: Rabies virus proteins synthesis in infected BHK-21 cells. *J. of Virol.* 1977; 22:102-112.
51. Martínez A. Etude Chez L' Homme D' Un Superantigene Viral: La Nucleocapside du Virus Rabique. Thèse de Doctorat. Université de Paris VI. Paris, France. 1994.
52. McClure M. A. and J. Perrault. Two domains distantly related to protein-tirosine kinases in the vesicular stomatitis virus polymerase. *Virology* 1989; 172 (1):391-397.
53. McCormack J.E., Callahan J.E., Kappler J. and P. C. Marrack. Profound deletion of mature T cells in vivo by chronic exposure to exogenous superantigen. *J. Immunol.* 1993; 150 (9): 3785-3792.
54. Michel G., Kemény L., Peter R.U., Beetz A., Ried C., Arenberger P., Ruzicka T. Interleukin-8 receptor -mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. *FEBS Lett.* 1992; 305:241-243.
55. Minamoto N., Tanaka H., Hishida M., Goto H., Ito H., Naruse S., Yamamoto K., Sugiyama M., Kinjo T., Mannen K and K. Mifune: Linear and conformational-dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus. *Microbiol. Immunol.* 1994; 38 (6): 449-455.
56. Montaña-Hirose J.A.. Efficacite du Traitement Antirabique: Extension au Lyssavirus de la Chauve-Sours Europeenne (EBL) et Role De L' Immunosuppression. Thèse de Doctorat. Université de Paris VI. Paris, France. 1994.

57. Montaña-Hirose J.A., Lafage M. and M. Lafon: Measurement of rabies virus N protein in rabies vaccines. *Res Virol.* 1995; 146: 217-224.
58. Morimoto K., Ohkubo A., Kawai A. Structure and transcription of the glycoprotein gene of attenuated HEP-Flury strain of rabies virus. *Virology* 1989; 173 (2):465-477.
59. Murphy F.A. Morphology and morphogenesis. In: *The Natural History of Rabies*. Edited by Baer G. Vol. I. Academic Press. New York. 1975.
60. Murphy W.J., Durum S.K., Anver M.R. and D.L. Longo. Immunologic and hematologic effects of neuroendocrine hormones. *J. Immunol.* 1992; 148 (12):3799-3805.
61. Nanney L.B., Mueller S.G., Bueno R., Peiper S.C. and A. Richmond. Distributions of melanoma growth stimulatory activity or growth-regulated gene and the interleukin-8 receptor B in human wound repair. *Am. J. Path.* 1995; 147 (5): 1248-1260.
62. Osada S., Mizuno K., Saido T.C., Suzuki K., Kuroki T and Ohno S. A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell Biol.* 1992; 12 (9): 3930-3938.
63. Owens F.N, Dubeski P. and C.F. Hanson: Factors that alter the growth and development of ruminants. *J. Anim. Sci.* 1993; 71:3138-3150.
64. Patton J.T., Davis N.L. and Wertz G.W. N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 1984; 49: 303-309.
65. Perrin T., Portnoi D. et Surreau P.: Étude de l'adsorption et de la pénétration du virus rabique: interaction avec les cellules BHK-21 et des membranes artificielles. *Annales de l'Institute Pasteur-Virologie* 1982; 133E:403-422.

66. Perry L.L., Hotchkiss J.D. and D.L. Lodmell: Murine susceptibility to street rabies virus is unrelated to induction of host lymphoid depletion. *J. Immun.* 1990; 144 (9): 3552-3557.
67. Pidduck H.G. and Falconer D.S. Growth hormone function in strains of mice selected for large and small size. *Genet. Res.* 1978; 32:195-206.
68. Rayssiguier C., Cioe L., Withers E., Wunner W.H. and P.J. Curtis. Cloning of rabies virus matrix protein mRNA and determination of its amino acid sequence. *Virus. Res.* 1986; 5 (2-3):177-190.
69. Rose-John S., Dietrich A. and Marks F. Molecular cloning of mouse protein kinase C (PKC) cDNA from Swiss 3T3 fibroblasts. *Gene* 1988; 74 (2): 465-471.
70. Russell-Jones D.L., Weissberger A.J., Bowes S.B., Kelly J.M., Thomason M., Umpleby A.M., Jones R.H. and P.H. Sönksen. Protein metabolism in growth hormone deficiency, and effects of growth hormone replacement therapy. *Acta Endocr.* 1993; 128 (Suppl 2):44-47.
71. Saltiel A.R. Signal Transduction: Pathways as drugs targets. *Sci. & Med.* 1995; Nov./Dec.: 58-67.
72. Seif I., Coulon P., Rollin P.E. and A. Flammand: Rabies Virulence: Effect on Pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 1985; 53: 3, 926-934.
73. Sikes R.K., Clearle W.F., Kopowski H., Wiktor T.J. and Kaplan M.M.: Effective protection of monkey against death by street virus by post-exposure administration of tissue-culture rabies vaccine. *Bull. WHO* 1971; 45:1-11.
74. Sokol F., Schlumberger H.D., Wiktor T.J., Koporowski H. and Hummeler K.: Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA the rabies virus. *Virol.* 1969; 38:651-665.
75. Sokol F. Purification of rabies virus and isolation of its components. In: Kaplan M. and Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies.* Third Edition. Geneva. World Health Organization. 1973.

76. Superti F., Derer M. and Tsiang H.: Mechanisms of rabies virus entry into CER cells. *J. of Gen. Virol.* 1994; 65:781-789.
77. Szekanecz Z., Shah M.R., Harlow L.A., Pearce W.H., Koch A.E. Interleukin-8 and tumor necrosis factor- α are involved in human aortic endothelial cell migration: the possible role of these cytokines in human aortic aneurysmal blood vessel growth. *Pathobiology* 1994; 62: 134-139.
78. Takita-Sonoda Y., Fuji H., Mifune K., Ito Y., Hivage M., Nizhizono A., Mannen K. and N. Minamoto: Resistance of mice vaccinated with rabies virus internal structural proteins to lethal infection. *Arch. Virol.* 1993; 132: 51-65.
79. Tordo N., Poch O., Ermine A. and Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14: 2671-2683.
80. Tordo N., De Haan P. Goldbach R and O. Poch: Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Sem. Virol.* 1992; 3:341-357.
81. Torres-Anjel M.J., Wolff W., Mollet T., Martz F.A., Kintner L., Blendon D.C., Oakman J.K., Volz D., Riordan M., Wilson M. and M. Stafford: Hypophyseal involvement and immuno-growth depression in rabies. I. Bovine paralytic rabies. *Proc. 14th World Congress on Diseases of Cattle, Dublin* 1986; 2: 1288-1293.
82. Torres-Anjel M.J., Blendon D.C. and K. Loreto: The peculiar effect of rabies virus on pituitary cell tissue cultures. *Vet. Med Rev.* 1987; 8 (1): 7-9.
83. Torres-Anjel M.J., Volz D., Torres M.J.R., Turk M. and J.G. Tshikuka. Failure to thrive, wasting syndrome, and immunodeficiency in rabies: A hypohyseal/hypothalamic/ thymic axis effect of rabies virus. *Rev. Infect. Dis.* 1988; 10 (Suppl 4): S710-S725.
84. Tshikuka J.G., Torres-Anjel M.J., Blendon D.C. and S.C. Elliot: The microepidemiology of wasting syndrome, a common link to diarrheal disease, cancer, rabies, animal models of AIDS, and HIV-AIDS (HAIDS): the

- feline leukemia virus and rabies virus models. Annals of the New York Academy of Sciences. 1992; 653: 274-296.
85. Tsiang H. and F. Superti: Ammonium chloride and chloquin inhibit rabies virus infection in neuroblastoma cells. Arch. of Virol. 1984; 81: 377-382.
86. Tsiang H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. Adv. Virus Res. 1993; 42: 375-412.
87. van Buul S. and Van den Brande J.L. The Snell-dwarf mouse. II. Sulphete and thymidine incorporation in the costal cartilage and somatomedin levels before and during growth hormone and thyroxine therapy. Acta Endocrinol. (Copenhagen) 1978; 89:646-658.
88. Voet D. and J.G. Voet. (1990). Bioquímica. Ediciones Omega. España.
89. Wagner R.R. and J.K. Rose. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Third Edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. 1996.
90. Wallis M. and Dew J.A. The bioassay of growth hormone in Snell's dwarf mice: Effects of thyroxine and prolactin on dose-response curve. J. Endocrinol. 1973; 56:235-243.
91. White A., Handler P., Smith E.L., Hill R.L. and I.R. Lehman. Principios de Bioquímica. Sexta Edición (Segunda en español). McGraw-Hill. España. 1983.
92. Wiktor T.J., McFarland R.I. and Koprowski H. Rabies virus pathogenicity. In: Rabies in the Tropics. Edited by E. Kuwert, C. Mérieux, H. Koprowski and K. Bögel. Springer-Verlog. Heidentberg. 1985.
93. Wunner W.H., Reagan K.J. and Kopowski H.: Characterization of saturable binding sites for rabies virus. J. of Virol. 1984; 50: 691-697.
94. Wunner W.H., Larson J.K., Dietzchold B and C.L. Smith. The molecular biology of rabies virus. Rev. Infec. Dis. 1988; 10(Suppl 4): S771-S784.

95. Yao Z., Painter S.L., Fanslow W.C., Ulrich D., Macduff B.M., Springs M.K., and R.J. Armitage. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 1995; 155:5483-5486.
96. Yue T.L., Wang X., Sung C.P., Olson B., McKenna P.J., Gu J.L. Feurstein G.Z. Interleukin-8: a mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1994; 75: 1-7.
97. Zhou Y., Xu B.C., Mahshwari H.G., He L., Reed M., Lozykowski M, Okada S., Cataldo L., Coschigamo K., Wagner T.E., Baumann G. and J.J. Kopchick. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1997; 94: 13215-13220.