

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

**PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS CD4+ y CD 8+ EN BAZOS
DE RATONES INOCULADOS CON UN PLÁSMIDO QUE
EXPRESA LA PROTEÍNA 'G' DEL VIRUS DE LA RABIA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA
P R E S E N T A :
GERARDO GUILLERMO VERA Y CUSPINERA

TUTOR: DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO

COMITE TUTORAL:
DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN
DR. ALVARO AGUILAR SETIEN
DR. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ
DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Agradecimientos:

A mi madre, por el amor que me dio, el cual se ha traducido en fuerza y valor para enfrentar con perseverancia los desafíos de la vida; por la sensibilidad con que me formó, que me ha permitido descubrir lo bello y lo bueno de los seres humanos.

A mi padre, quien, con su ejemplo, me preparó para ser mejor persona y padre.

A mis hijos, para quienes he querido ser ejemplo y amigo. Si cuando niños yo los guíé para salir adelante, ahora ellos son un impulso para realizar nuevos proyectos.

A mis hermanos, por su apoyo en los momentos difíciles que hemos compartido y de los que hemos salido juntos.

A María de los Ángeles, quien con su amor y comprensión, ha hecho más llevaderos los esfuerzos para culminar con éxito este proyecto postergado.

Éste es también un momento para asumirme plenamente como un eslabón de una sólida cadena familiar: un cariñoso recuerdo a quienes siguen estando presentes, no obstante que ya se fueron.

Por otra parte, esta investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de muchos maestros, colegas, compañeros e instituciones.

En primer lugar, expreso mi reconocimiento a la doctora Elizabeth Loza Rubio, mi tutora, quien creyó en mi y me brindó su orientación y, sobre todo, su preocupada insistencia.

Asimismo, agradezco al doctor Eliseo Hernández Baumgarten, por su generosidad e impulso para terminar este trabajo, al igual que a la doctora Luvia Enid Sánchez Torres, quien compartió conmigo sus conocimientos, tiempo y recursos.

No quiero dejar de agradecer también la valiosa contribución al doctor Álvaro Aguilar Setien y al M.V.Z. Emiliano Tesoro Cruz.

También estoy en deuda con el M.V.Z. Fernando Diosdado por su colaboración en el trabajo estadístico, y con mis compañeros de laboratorio, por su invaluable apoyo, en especial, con la Q.F.B. Edith Rojas, la Med. Cir. Mary Carmen Godinez, Luís Gómez Núñez.

Por último, pero no por ello menos importante, manifiesto mi agradecimiento a las autoridades de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por haberme concedido el apoyo institucional para obtener el grado.

Igualmente agradezco a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, donde se realizó el estudio citofluorométrico, bajo la dirección de la doctora Luvia Enid Sánchez Torres y con el financiamiento de la CGPI (proyecto clave 20040289).

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
Definición	2
Antecedentes	2
Situación de la enfermedad	3
Transmisión	5
Características del virus	7
Clasificación	7
Propiedades del virus	8
Epidemiología	9
Patogénesis	10
Signos clínicos	11
Patología	13
Diagnóstico	13
Inmunología	14
Vacunas contra la rabia	15
Vacunas de ingeniería genética contra la rabia	21
Citometría de flujo	24
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivo general y particulares	27
2. Material y métodos	28
3. Resultados	34
4. Discusión	44
5 Conclusiones y recomendaciones	52
6 Referencias	53

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de bazo de ratones inoculados con una vacuna antirrábica de ADN desnudo, que contienen la glicoproteína del virus de la rabia de una cepa vampiro, se amplificó en una cepa de *Escherichia coli* DH10B, y se purificó utilizando el sistema comercial: "Endofree Plasmid Giga Kit" (Quiagen ®). Se formaron cinco grupos de ratones BALB/C de 6- 8 semanas de edad, se inocularon por vía intramuscular (IM), de la siguiente manera: grupo 1, con agua de inyección (testigo); grupo 2, vacuna comercial; grupo 3, plásmido pCI-neogpVR grupo 3, adyuvante CpG's y grupo 4 plásmido pCI-neogpVR +CpG's. Se sacrificaron 3 ratones de cada grupo, a los días 1, 4, 7, 15, y 30 para cuantificar por citometría de flujo, el porcentaje de las células T CD4⁺ y T CD8⁺ de la población total de linfocitos del bazo y así determinar su proliferación. Por otro lado se formaron otros grupos que incluían 9 ratones cada uno. Estos fueron inoculados de la misma manera que en el experimento anterior. Estos animales fueron desafiados al día 90 post-vacunación con 50-100 DL₅₀ %, con virus homólogo al de la vacuna génica. La máxima proliferación de T CD4⁺ fue al día 15 en los animales vacunados con el plásmido pCI-neogpVR+CpG's, no se observaron diferencias significativas en la proliferación de T CD8⁺ entre el testigo y los grupos estudiados. La vacuna de ADN desnudo en los diferentes tratamientos protegió un 77%; mientras que la comercial un 100 %.

Palabras clave: Rabia, Vacuna génica (ADN), glicoproteína, inmunidad celular rabia T CD4⁺ y T CD8⁺.

1. INTRODUCCION

Definición

La rabia es una enfermedad infecto contagiosa, causada por un virus por un virus ARN de cadena sencilla, de la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus* (Hemachudha *et al* 2002), es considerada una zoonosis que infecta a los animales domésticos y salvajes (Weiland *et al* 1992, Cliquet & Picard-Meyer 2004).

Antecedentes

La palabra rabia, proviene del sánscrito *rabhas*, la cual se traduce como "que induce a la violencia", y se refiere al período Védico de la India (30 siglos A. C). Algunos autores consideran que es una de las enfermedades más antiguas conocidas por la humanidad. Las primeras descripciones datan del siglo XXIII a. C. en el Códice Eshunna, premosaico que precede al Código de Hammurabi en Babilonia (Jakson *et al* 2000). Desde entonces hay numerosas referencias históricas, principalmente asociadas a los perros, (Pearce 2002) así como descripciones de la enfermedad de médicos griegos y romanos (Fu 1997). Al igual que en sánscrito, la raíz griega *lyssa* significa violento, Demócrito y Aristóteles también hacen referencia a la rabia. Cornelius Celsus, en el primer siglo d. C., hace la primera descripción de la rabia humana (Rupprecht *et al* 2002). Los primeros reportes de rabia en México datan de 1709, cuando se registró la primera epizootia de rabia en los perros callejeros de la ciudad de México y otras ciudades vecinas como Puebla, afectando también al ganado y a los humanos, el perro callejero representaba ya un problema de Salud Pública (CDC 1998, Secretaría de Salud México 2001)

Para la Organización Mundial de la Salud, (OMS), cada 10 ó 15 minutos alguien muere por causa de la rabia y, cada hora, mil personas reciben tratamiento antirrábico en el mundo (WHO 2001, Loza-Rubio y Gómez-Lin 2004) .Mucha de esta gente recibe un tratamiento inadecuado o inseguro (Lodmell *et al* 1998, Sampatha *et al* 2005). En nuestro país, la experiencia ha permitido reducir el impacto de la rabia a través de intervenciones específicas, como son los programas de vacunación emprendidos por las autoridades en materia de salud (Secretaría de Salud México 2001)

Situación de la enfermedad

La rabia se encuentra distribuida en todos los continentes, exceptuando la Antártica y otras regiones insulares como Islandia, Japón y el Reino Unido. El número de países libres de rabia es pequeño comparado con los afectados; entre los considerados libres de rabia se encuentran algunas naciones europeas como Bélgica, Finlandia, Francia, Grecia, Noruega, Portugal, España, Suecia y Suiza (Rupprecht *et al* 2002, CDC 2003).

La rabia ha sido clasificada dentro de las enfermedades infecciosas emergentes, la situación de la rabia en la Federación Rusa es seria (Stantic-Pavlinic 2002), al igual que el resto de Europa en donde la epidemiología de esta zoonosis ha cambiado, en la actualidad un importante número de variantes de Lyssavirus se han aislado de murciélagos (Cliquet & Aubert 2004) de igual forma ocurre en algunas partes de EUA, Centro América y Asia (Krebs *et al* 2003).

El número de muertes anuales por esta enfermedad, se ha estimado entre 40 000 y puede llegar hasta más de 70 000 casos en países densamente poblados como lo es África y Asia donde la rabia es endémica. Se ha estimado que 10 millones de personas reciben tratamiento post-exposición cada año por haber estado expuestos a animales sospechosos de rabia. Los niños entre los 5 y 15 años de edad están entre la población de mayor riesgo. Más del 99% de estas defunciones ocurren en Asia, África y Sud América. Solamente en la India se reportan más de 30 000 muertes anuales (WHO 2001).

En aproximadamente 100 países donde la rabia es enzoótica, ésta se presenta tanto en animales domésticos como silvestres, lo que representa un riesgo potencial para las personas que viven en estas áreas (WHO 2002).

Australia había sido considerada libre de rabia hasta 1996, cuando se aisló un virus con alta similitud genética al de la rabia, y fue conocido como Australian bat lyssavirus (ABL). Este virus fue recuperado de murciélagos frugívoros del género *Pteropus* (*Pteropus alecto*, *P. poliocephalus*, *P. scapulatus* y *P. conspicillatus*) (Field *et al* 1999, WHO 2002).

En Norte América y Europa, la rabia en animales domésticos está bajo control; sin embargo, en Canadá y Estados Unidos, su rápida diseminación en mapaches es el principal problema (Russell *et al* 2005).

En Europa, a 20 años del programa de vacunación oral en zorros, se ha reducido el número anual de animales infectados de 20,000 a aproximadamente 6,000. En países de Europa Central y del Este, en la actualidad aún hay numerosos casos (Frolich *et al* 2002, OIC 2003 World Organisation for Animal Health), en la década de los setenta, la rabia silvestre se exacerbó, teniendo en los zorros rojos y mapaches los mas importantes reservorios (Eisinger *et al* 2005).

En México, durante la última década 1990-2000, tanto la rabia en humanos como la canina han dado un giro en su comportamiento, registrándose las cifras más bajas conocidas a la fecha., se presentó una reducción sostenida de 60 casos durante 1990 a cero casos para el año 2000 (Secretaría de Salud México 2001), la tasa de mortalidad es de 0.01 x 100.000 habitantes es inferior a la del resto del continente estimada en 0.1 x 100.000 habitantes (OPS 2001).

Circunstancias diferentes se presenta para la rabia silvestre, en los últimos tiempos se detecta un incremento, de la rabia humana, en especial la transmitida murciélagos, seguidos por zorro y zorrillo, condición que representa la transición epidemiológica de la rabia del ciclo urbano a los ciclos silvestres (Aranda *et al* 1999). El Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades Programa de Zoonosis de la Secretaría de Salud México informa un incremento de casos confirmados por laboratorio de otras especies que no sean perros de 68 en 2003 a 98 en el primer trimestre para el segundo trimestre 156 y 210 para el tercer trimestre de 2004 (Secretaría de Salud México 2004).

La mayoría de los casos de rabia paralítica bovina, que se han reportado en México en los últimos tres años, abarca a 23 entidades del país, en vastas regiones de la vertiente del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas y, por la vertiente del Golfo de México, desde el sur de Tamaulipas hasta la península de Yucatán, incluyendo además todo el Istmo de Tehuantepec, así como la región Centro-Sur. Estas zonas comprenden 188 municipios que reúnen las condiciones climatológicas propicias para el desarrollo de los murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*), los cuales son los principales agentes transmisores. Durante 2003, se reportaron 182 casos positivos de

rabia paralítica bovina, con las consiguientes pérdidas económicas para la ganadería nacional (SAGARPA 2004).

Transmisión

Esta ocurre cuando un reservorio o animal enfermo disemina el virus, el modo más común es la mordedura a un huésped susceptible (Poranen *et al* 2002, CDC 2004). Han sido reportadas otras vías de contaminación como son las membranas mucosas de ojos, nariz y boca, así como mediante aerosoles, cuando hay vampiros presentes, y menos frecuentemente los trasplantes de córnea y otros órganos incluyendo riñón (Smith 1996, Hemachudha *et al* 2002, PHAC 2004, Srinivasan *et al* 2005).

El principal reservorio de rabia en Latinoamérica, África y Asia es el perro (Velasco-Villa *et al* 2002), en Europa y Norte América, los zorros; el mapache en el este de los EUA, las mofetas en el medio oeste de este país y oeste de Canadá; coyotes en África, Asia y Norte América (Fu 1997, Krebs *et al* 2003) en Latinoamérica, el murciélago vampiro, desde México hasta el norte de Argentina (Delpietro *et al* 2001), en Norteamérica (CDC 2004) y en Europa, los murciélagos insectívoros, son los responsables de que la rabia sea considerada como una zoonosis emergente (Fooks *et al* 2003, Cliquet & Picar-Meyer 2004, Rodney *et al* 2004).

En México, la enfermedad se transmite principalmente en dos formas: la terrestre que se da entre los perros, y la aérea, entre los murciélagos hematófagos (Loza-Rubio *et al* 1998, Aranda *et al* 1999, Velasco-Villa *et al* 2002).

El número de casos de rabia transmitida por perro confirmados va en disminución en las ciudades del país, tal decremento de los casos de rabia canina y consecuentemente los ocurridos en humanos, se ha debido principalmente a la implementación de las campañas permanentes y a las Semanas Nacionales de Vacunación Antirrábica Canina establecidas por la Secretaría de Salud (Secretaría de Salud México 2001).

Los casos han ocurrido principalmente en localidades semirurales, debidos a la agresión por fauna silvestre y en particular por quirópteros, zorrillos, zorros y mapaches (Secretaría de Salud México 2001).

La rabia en animales silvestres, constituye una problemática particular, que requiere métodos de control especializados, el SIVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) reporta entre 1996 a Agosto de 2002, 112 casos positivos a rabia, en especial debidos a quirópteros (46.4%), y zorrillos (23.2%) en zorros (6.2%), en mapaches (6.2%), en marsupiales (3.6%), en ciervos (3.6%), en tejones (2.7%), en felinos salvajes (2.7%), en coyotes (1.8%), 2 en agutí (1.8%) en coatí (0.9%) y 1 en ardilla (0.9%). En 2004 se reportan casos como zoonosis positivos a rabia uno en Quintana Roo y uno en Sinaloa, hasta mayo de 2005, no se ha reportado caso alguno (Secretaría de Salud México 2004).

La rabia paralítica bovina o derriengue se presenta actualmente en 23 entidades federativas. Se estima que anualmente mueren entre 15 mil y 20 mil bovinos a causa de la enfermedad de la rabia, con una población de bovinos en riesgo superior a los 10 millones de cabezas. La distribución de los brotes de derriengue coincide con el hábitat de las poblaciones de *Desmodus rotundus* que comprende principalmente: la vertiente del pacífico, desde Sonora y sur de Chihuahua hasta Chiapas y la costa del Golfo de México y del Caribe, desde el sur de Tamaulipas hasta la península de Yucatán, y en los estados del altiplano, como Morelos, Puebla, Tlaxcala, Estado de México (SAGARPA 2004).

Las condiciones ambientales de las zonas tropicales y subtropicales del país son propicias para el establecimiento de los murciélagos hematófagos. Asimismo la gran diversidad orográfica de nuestro territorio aporta una variedad de refugios, los cuales son utilizados por estos quirópteros, así como minas y construcciones abandonadas, túneles, alcantarillas, troncos huecos y hendiduras en las paredes rocosas (Flores 2003).

La enfermedad ocasiona serios daños a la ganadería nacional, estimados en la muerte de entre 15 y 20 mil cabezas anuales, en promedio, lo cual conlleva pérdidas económicas del orden de entre 75 y 100 millones de pesos, sin contar animales de registro, lo cual incrementaría estas pérdidas. En el año 2000, se confirmaron 271 casos. (SAGARPA 2004).

Considerando su distribución mundial, incidencia, costos de salud pública y veterinaria, así como la mortalidad de los casos presentados, la rabia es la

zoonosis viral más importante reconocida hasta hoy (Meltzer and Rupprechet 1998, Rupprechet et al 2002).

Características del virus

Clasificación

El virus de la rabia perteneciente al orden de los *Mononegavirales*, familia *Rhabdoviridae* género *Lyssavirus*. El orden comprende cuatro familias; *Paramixoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* y *Rhabdoviridae*, así como una gran variedad de virus no bien clasificados, aislados de plantas. En la actualidad, la familia *Rhabdoviridae* de los mamíferos se dividen de acuerdo con sus características antigénicas y bioquímicas en cuatro géneros: *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus* y *Rhabdovirus* (Woldehiwet 2002).

El rango de huéspedes de los *Rhabdovirus*, incluye vertebrados (mamíferos y peces) e invertebrados (artrópodos). El virus de la rabia es el prototipo del género *Lyssavirus*, los miembros se caracterizan por su forma cónica o de bala. (Smith 1996, Rupprechat et al 2002, Sato et al 2004).

En la actualidad, para la clasificación del virus, se realizan estudios de secuenciación, y se le ha clasificado en siete genotipos (Bourhy et al, 1993) y dos que aún no han sido clasificados (Botvinkin et al 2003). El genotipo 1 (RABV) comprende al virus de rabia clásica y se encuentra distribuido en todo el mundo; genotipo 2 (Lagos bat virus), fue aislado de murciélagos frugívoros (*Eidolon helvum*) en Nigeria en 1956 y en 1974 de murciélagos (*Micropteropus pusillus*) en la Republica Centroatricana, el genotipo 3 (Mokola virus) aislado de musarañas (*Crocidura* sp.), de un niño en Nigeria en 1968 , de una niña en Nigeria in 1971 y gatos en Zimbabwe, el genotipo 4 (Duvenhage virus) fue originalmente aislado de un hombre que había sido mordido por un vampiro en Sud Africa en 1970 y de murciélagos *Miniopterus* sp. en 1981, el genotipo 5, (EBLV-1) aislado de murciélagos Europeos (European bat lyssavirus 1), de murciélagos (*Eptesicus serotinus*) en Alemania en 1968, en Polonia en 1985, y aislados en Dinamarca, Holanda y España en 1987 y en Francia en 1989. Algunos EBLV-1 fueron obtenidos de murciélagos en Ucrania y de un caso humano de origen murciélagos en Rusia; en 1985, el genotipo 6 o de murciélagos Europeos 2 (European bat lyssavirus 2 o EBLV-2), fue aislado de

casos humanos en Finlandia en 1985 y de murciélagos en Holanda, Suiza y el Reino Unido. EBLV-2 se encuentra principalmente en murciélagos del género *Myotis* (*Myotis dasycneme* y *M. daubentonii*). El genotipo 7 o de Australian bat Lyssavirus (ABLV) fue aislado de cinco especies del murciélago (flying fox bats), una especie del murciélago insectívoro y dos casos humanos infectados en 1996, (Arai *et al* 2003) y los dos nuevos virus aún no han sido clasificados aislados de murciélagos insectívoros de Asia Central (Botvinkin *et al* 2003).

Propiedades del virus

La partícula del virus de la rabia se asemeja a una bala, con un diámetro fluctuante de 75 nm a 80 nm por 180 a 200 nm, con una nucleocápside helicoidal rodeada por una fina membrana dentro de la cual está contenido el genoma viral. Éste tiene 11,932 nucleótidos y es no segmentado. El virión está constituido por cinco genes que codifican para el mismo número de proteínas, las cuales se distribuyen en dos componentes principales: la nucleocápside (NC) y la envoltura. La nucleoproteína, que es interna, es un complejo ribonucleoproteínico con simetría helicoidal, constituido por el ARN de polaridad negativa, que se encuentra asociado a la proteína N que lo protege de ribonucleasas y se supone que provee la configuración adecuada para la transcripción, junto con la fosfoproteína (no estructural) y la proteína L que es la polimerasa viral (Koser *et al* 2004). Por su parte, la envoltura está formada por la proteína M que es una proteína de matriz que se encuentra en la cara interna de la membrana. Finalmente, la proteína más externa es la G (glicoproteína) de 505 aminoácidos (65 kDa), que está glicosilada y se encuentra localizada en la envoltura viral; es transmembranaria y forma en la superficie del virus espículas homotriméricas ancladas a la bicapa lipídica de la membrana (Langevin *et al* 2002).

La proteína G, ha sido la más estudiada debido a que esta involucrada en el tropismo y patogenicidad del virus, (Faber *et al* 2004) interactúa con los receptores celulares, promoviendo la fusión del virus con la membrana, lo que facilita la rápida penetración del virus (Cox *et al* 1977, Prehaud *et al* 2003, Takayama-Ito *et al* 2004). De la integridad de la proteína de G depende la producción de anticuerpos neutralizantes y la estimulación de células T. Para el

virus la proteína G le es esencial para brotar a través de la membrana celular. (Faber *et al* 2004).

La estructura de la glicoproteína G del virus de la rabia favorece la inducción de los anticuerpos neutralizantes tipo IgG y no IgM (Whitt *et al* 1991, Woldehiwet 2002)

Esta proteína esta compuesta de un endodominio, el cual interactúa con las proteínas internas, una región transmembranal y un ectodominio, el cual es el sitio antigénico que reconocen las células B y T además de ser el sitio responsable del reconocimiento para los receptores y la fusión con la membrana (Badrane *et al* 2001) .

Mediante anticuerpos monoclonales, se han descubierto los determinantes antigénicos de esta glicoproteína y estos pueden ser clasificados en determinantes conformacionales y lineales, estos determinantes son de importancia en especial el determinante III, donde se encuentra la arginina 333 que es crítica para la neutralización del virus, y la invasión a las células nerviosas (Johnson *et al* 2002).

Epidemiología.

El virus de la rabia es extremadamente frágil y no persiste en el medio ambiente, por lo que debe permanecer en un mamífero para sobrevivir y replicarse, lo que ocurre cuando es mantenido por algunos carnívoros y quirópteros en niveles de transmisión entre endémicos a epidémicos (Krebs 2003). Un gran número de mamíferos están envueltos a lo largo del mundo en el mantenimiento de la rabia y su transmisión (MacInnes *et al* 2001, Constantine, 2003, Krebs *et al* 2003).

Los principales vectores se han clasificado en dos grupos primarios carnívoros, por ejemplo, perro, los coyotes, zorros rojos del Ártico, y grises, chacales, mangostas, mapaches, mofetas, y lobos (Smith 1996 Randall *et al* 2004), de los cuales el perro callejero o salvaje sigue siendo el principal transmisor de rabia a los humanos, en especial en los países en vías de desarrollo, como ocurre en los de Latinoamérica (Velasco-Villa *et al* 2002). El otro grupo lo constituyen los quirópteros, en especial el murciélago vampiro (Flores 1991, Sheeler-Gordon & Smith 2001).

Muchas especies animales incluyendo el hombre son susceptibles pero no transmiten la enfermedad; ellas son víctimas de rabia y normalmente la muerte

rompe o termina la cadena epidemiológica, como ocurre con el ganado, camellos, y caballos y sus muertes se agregan a la carga económica representada por la enfermedad (Meltzer *et al* 1998, Rupprecht *et al* 2002).

Con el propósito de diseñar eficientes programas de control de esta enfermedad, se requiere un apropiado conocimiento de los ciclos epidemiológicos (terrestres o aéreos), lo que se logra mediante el estudio del genoma viral (Loza-Rubio *et al* 1998, Nadin-Davis *et al* 2003). Las diferencias en los nucleótidos permite la identificación de variantes del virus y su asociación con los brotes de la enfermedad y determinar la filogénesis del virus, aunado a la identificación del vector (David 2000, Nishizono *et al* 2002).

Patogénesis

El hombre o algún otro mamífero se infecta con rabia por la mordedura de un animal rabioso o por la exposición de alguna de sus mucosas al virus (Lafon 2005), se han documentado casos de rabia después del transplante de órganos (Srinivasan *et al* 2005).

Bajo condiciones naturales, el hombre y los animales, pueden experimentar diferentes periodos de incubación (tabla 1), en el hombre este lapso usualmente ocurre entre los 20 días y los tres meses, aun cuando se han documentado casos de hasta un año. Los eventos que ocurren en el periodo de incubación son inciertos, y no han sido demostrados en modelos animales (Jackson *et al* 2002).

Perros	3 a 8 semanas
Gatos	3 a 8 semanas
Bovinos	3 a 15 semanas
Caballos	3 a 6 semanas
Zorros	3 a 10 semanas
Mapaches	3 a 12 semanas
Zorrillos	5 a 20 semanas
* Determinados mediante estudios experimentales	

Tabla 1 Periodos de incubación típicos para varias especies*(Hemachudha *et al* 2002)

Los pacientes o animales infectados mueren debido a paro cardíaco o falla respiratoria (Rupprecht *et al* 2002).

El virus entra al sistema nervioso por la vía de las neuronas motoras, a través de la unión neuromuscular, o bien a través de los nervios sensitivos, viajando de una neurona a otra hasta llegar al cuerno anterior de la médula en el hombre, o dorsal en los animales, donde se replica (Baloul *et al* 2003). El virus puede llegar hasta el cerebro, en donde infecta neuronas de varias regiones. (Shankar *et al* 1991, Rupprecht *et al* 2002).

Después de la replicación, en las neuronas del SNC se encuentran inclusiones citoplasmáticas denominadas corpúsculos de Negri (Weiland *et al* 1992). Del cerebro, el virus viaja de regreso a la periferia vía neuronas y puede llegar a las glándulas salivales, en el caso de los bovinos con rabia paralítica, no siempre se encuentra el virus en la saliva (Delpietro *et al* 2001), se le puede encontrar en las lágrimas, piel, adrenales, líquido cefalorraquídeo, hígado y otros tejidos (CCDR Canadá 2004, Srinivasan *et al* 2005).

No esta claro qué sucede cuando el virus invade y se replica en el cerebro (Fu 1997, Rupprecht *et al* 2002). En la autopsia, los pacientes que mueren de rabia muestran ligera inflamación en el cerebro (Hemachudha *et al* 2002). Estudios neuro-farmacológicos han sugerido que la muerte por rabia se debe a alteraciones funcionales más que a daños estructurales (Baloul & Lafon 2003).

Signos clínicos

En el hombre, la rabia se puede manifestar en forma furiosa (encefálica) o paralítica (muda), el diagnóstico es extremadamente difícil, en especial en esta última, debido a que se confunde con el síndrome de Guillain-Barré, con el que comparte sintomatología o cuando el paciente entra en coma (Laothamatas *et al* 2003, Srivastava & Liu 2004, Siddiqui *et al* 2005). En el hombre se describen tres fases: 1) prodrómica, 2) aguda o neurológica, 3) el coma y la muerte (Hemachchudha *et al* 2002)

En el perro se describen tres fases clásicas de la enfermedad: 1) excitación, 2) de perversión y 3) de parálisis. Sin embargo, no todos los animales progresan a través de cada una; las fases furiosa y paralítica pueden ser concurrentes. La fase de excitación, por lo general, dura entre 2 y 3 días. El animal muestra

cambios en su conducta, fiebre ligera, reflejo palpebral y comeano disminuidos y, en ocasiones, se observa auto mutilación en el sitio de la mordedura.

En la fase de perversión, el animal pasa de periodos de cansancio, a irritabilidad y agresión, a los estímulos visuales, auditivos responde con ladridos. Por lo general, el perro abandona su casa y recorre largas distancias, atacando objetos animados o inanimados. Al final de esta fase, puede desarrollar convulsiones generalizadas de tipo epileptiforme.

La fase de parálisis comienza entre 2 y 4 días después del inicio de los signos clínicos, y al inicio de ésta se observa la parálisis laríngea y faríngea que es la que provoca los cambios en el ladrido, salivación excesiva, disfagia y disnea. La muerte resulta del estado de coma y el paro respiratorio. Si la infección temprana del sistema límbico provoca cambios de carácter y conducta sexual aberrante. Si el virus se propaga a la corteza causa depresión terminal y el coma (Barloug 1992).

En el ganado bovino, los signos clínicos son variables. Usualmente inicia como una depresión generalizada, la cual pasa desapercibida o bien es atribuida a una infección de tipo bacteriano o viral, pérdida del apetito y caída de la producción láctea. Con el progreso de la enfermedad, se observa que el apetito se deprava, el animal come piedras, madera etc. Algunos de los animales pueden desarrollar una forma furiosa de la enfermedad. En ellos se observan cambios en la conducta sexual, atacan a otros animales e inclusive al hombre y a objetos inanimados. Durante este periodo pueden presentar violentas reacciones, convulsiones y la muerte sobreviene por un colapso (Murphy *et al* 1999).

La forma más común de la rabia es la paralítica, a la que se conoce con el nombre de derriengue, o paresiante, debido a que los signos clínicos asemejan a un animal "derrengado o quebrado" de los cuartos posteriores. Los signos se inician con una ligera cojera, temblor de algunas masas musculares, excesiva salivación, dificultad para tomar agua, aun cuando la busca; no hay hidrofobia, esto puede llegar a confundirse con una obstrucción en la garganta o esófago. La parálisis es progresiva durante de 4 a 7 días y el animal cae, y la muerte sobreviene rápidamente (Andrews *et al* 2004).

Patología

Las manifestaciones patológicas de la rabia se manifiestan en el SNC como una aguda encéfalomiелitis, (Hemachchudha *et al* 2002) la apariencia macroscópica muestra moderada congestión de las meninges. Las lesiones microscópicas que pueden encontrarse es la picnocietosis de las neuronas, ligera inflamación subaracnoidal e infiltración perivascular por linfocitos y leucocitos polimorfonucleares (Jackson *et al* 2002, Shin *et al* 2003).

La infección por rabia frecuentemente causa en las neuronas cuerpos de inclusión eosinofílica citoplasmática, los llamados corpúsculos de Negri, los que se localizan en el hipocampo y células de Purkinje del cerebelo. Estas inclusiones se han identificado como las áreas de replicación viral activa para la identificación del antígeno viral (Smith 1996).

Diagnóstico

Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de rabia en los animales es difícil, y puede juzgarse a los perros rabiosos como libres de rabia, lo que podría ser un peligro para el hombre. Igualmente personas mordidas por los animales con otras enfermedades como el moquillo podrían vacunarse contra la rabia innecesariamente (Warren *et al* 2001).

Diagnóstico de laboratorio

La naturaleza de la enfermedad demanda que las pruebas del laboratorio estén estandarizadas, sean rápidas, sensibles, específicas, baratas y confiables (Krebs *et al* 2002).

Anteriormente, dentro de las pruebas que se usan para el diagnóstico eran la histopatología y la tinción de Sellers. En la actualidad se usa la inmunofluorescencia (IF) (Hemachudha *et al* 2002), aún cuando es costosa y se requiere experiencia, así como la reacción en cadena de la polimerasa reversa (PCR-RT) (Woldehiwet 2002, Loza-Rubio *et al* 2005), la prueba de ELISA permite un diagnóstico rápido de rabia (WHO 1996, Gamoh *et al* 2003).

El aislamiento del virus puede ser necesario para confirmar los resultados de las pruebas antigénicas o para caracterizar el aislamiento (Jackson *et al* 2000).

Inmunología

La rabia es la única infección de tipo neurológico que puede ser prevenida dentro de un periodo razonable por la vacunación después de la exposición al virus (Hemachudha *et al* 2002), poco se conoce de la protección de respuesta inmune innata en el sistema nervioso central (CNC) (Rempel *et al* 2005). Sin la vacuna, el tropismo del virus le permite infectar al sistema nervioso y causar la muerte (Hooper 2005).

El virus de la rabia, se ha adaptado a las condiciones propias del SNC (Shankar *et al* 1991, Lafon 2005), las cepas patógenas del virus rábico al entrar en las células nerviosas, se hacen invisibles al sistema inmune, el virus no induce la apoptosis de las neuronas infectadas, la apoptosis puede ser considerada como un mecanismo de inmunidad innata contra el virus al interferir con su propagación (Balou *et al* 2003), además de suprimir la respuesta inmune en los órganos de la periferia, en especial en el bazo reduciendo la respuesta de las células T (Jackson *et al* 2000).

La respuesta inmune durante la infección es ineficaz, debido al relativo aislamiento del SNC conferido por la barrera hematoencefálica, (BBB por sus siglas en inglés) la cual cuando el sistema nervioso no ha sufrido daño impide el paso de anticuerpos y complemento al cerebro. El relativo aislamiento del SNC se complementa por la ausencia de vasos linfáticos que drenen el área (Jackson *et al* 2000).

Esta escasa respuesta inmune por parte del sistema nervioso durante la infección del virus de la rabia se debe a la ausencia de células presentadoras de antígenos (APCs), la imposibilidad de las células de la glia de salir del SNC, así como a la restricción que presentan los Linfocitos T de migrar al interior del SNC, la cual está dada por lo menos por tres diferentes factores:

- 1) La insuficiente presentación de los antígenos, debida a la ausencia de células APCs, y la regulación propia de las moléculas clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) por las neuronas.
- 2) Inmunosupresión de las células T y Th1, en particular por factores inmunosupresivos tales como la norepinefrina y otras moléculas similares.

3) La mínima expresión de moléculas clase I en las neuronas y la deficiente expresión de moléculas co-estimuladoras en las células del cerebro y en las células endoteliales de los capilares que dificultan el paso de las células T. (Jackson *et al*, 2000).

La respuesta inmune después de la vacunación permite prevenir la infección y la presentación de la enfermedad, si esta es aplicada dentro de un tiempo razonable (Hooper 2005).

Sobrevivir a la entrada del virus depende de la respuesta de las células T y la producción de anticuerpos, la expresión de moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y de que muchas células entren en apoptosis. Las células CD 8⁺ juegan un doble papel, junto con los anticuerpos, controlan la infección e inducen la apoptosis, iniciándose la reacción inmunopatológica (Jackson *et al* 2000, Kassis *et al* 2004).

Los anticuerpos neutralizantes del virus, bajo el control de las células T cooperadoras, juegan un papel crítico en la protección que confiere el sistema inmune (Jackson *et al* 2000). Las inmunoglobulinas producidas son contra las proteínas virales G y N (Woldehiwet 2002)

Se han detectado anticuerpos en contra la proteína N después de la vacunación con virus inactivado, así como en la infección natural. Los anticuerpos formados permiten eliminar al virus en las primeras etapas de la infección. Las células T citotóxicas por sí solas no son capaces de conferir protección contra el virus de la rabia; requieren de la participación de las Ig G (Jackson *et al* 2000).

Vacunas contra la rabia

Tipos de vacunas

En 1879, Victor Galtier, veterinario francés, demostró la transmisión en serie del virus de rabia de un perro a conejos, y por primera ocasión inmunizó ovinos mediante la inoculación de saliva por vía intravenosa (Pearce 2002) en 1885, Luis Pasteur, Roux y sus colaboradores, desarrollaron el primer tratamiento contra la rabia. La vacuna para prevenir la presentación de la enfermedad, fue elaborada en tejido nervioso crudo como tratamiento post exposición de rabia,

usando tejido nervioso infectado desecado. Este tratamiento se aplicó a Joseph Meister un chico de 9 años de edad. Al inocular con una vacuna que podría considerarse parcialmente inactivada, se marca el principio de la era moderna de la inmunización (Barne y Tsiang 1995).

En 1908, Fermi elabora una vacuna a partir de tejido nervioso, inactivado con formol. En 1911, en el Central Research Institute de Kausali en la India, Sir David Semple desarrolla una vacuna a partir de tejido nervioso de oveja y cabra inoculadas con virus e inactivado con fenol (Barne 1995).

Otros investigadores como Umen-Doi (1916), Hemp (1925) y Kelser siguen el mismo principio de utilizar tejidos animales e inactivarlos con diferentes agentes químicos como éter, cloroformo, etc. (Andral *et al* 1982). Para 1890, se habían establecido varios centros de tratamiento de rabia en varios países. En México, en 1888, el Dr. Eduardo Liceaga introduce la vacuna tipo Pasteur (Loza-Rubio y Gómez –Lin 2004).

De todas las vacunas, la tipo Semple se sigue utilizando en algunos países (Jacob 1997, Sampath *et al* 2005). Sin embargo, al ser éstas ricas en mielina, producen en algunos pacientes serias reacciones neurológicas, y la posibilidad de transmisión de la encefalitis espongiiforme, (Piyasirisilp *et al* 2002, Siddiqui *et al* 2005). Se han documentado múltiples problemas de desmientilización entre la población de los países que usan o usaron este tipo de vacunas, y los reportes se pueden encontrar en las publicaciones científicas destinadas al efecto (Srivastava *et al* 2004, Siddiqui *et al* 2005). La frecuencia de complicaciones neurológicas en países del Oriente medio en la década de los 90 era 1/200, entre 1392 adultos vacunados (Swamy *et al* 1991, Bahri *et al* 1996). En promedio, la Organización Mundial de la Salud lo señala en aproximadamente 1 en 8 000 a 1 en 27 000 casos estudiados (WHO 2002).

En 1954 en el Instituto de Bacteriología de Chile Fuenzalida y Palacios, desarrollaron una vacuna con la finalidad de reducir los riesgos de accidentes neurológicos, para ello utilizaron cerebros de ratón lactante infectados con virus de rabia, los que por su inmadurez no habían completado la mielinización de su tejido nervioso. Inicialmente el virus era inactivado con fenol (WHO 1996). Esta vacuna (hoy conocida como tipo Fuenzalida) se sigue utilizando aún en muchos países en vías de desarrollo ya que es fácil de preparar, al no requerir laboratorios altamente equipados. Sin embargo, ocurren trastornos asociados

con complicaciones neurológicas, estos rangos se redujeron de uno por cada 142 tratamientos a uno por cada 7000 (Dressen, 1997, Bonito *et al* 2004).

Esta primera generación de vacunas contra la rabia o de tejido nervioso no purificado (NTVs) se caracteriza por llegar a producir reacciones neurológicas graves, las dosis tienen baja concentración de antígeno, (Paolazzi *et al* 1999) y la posibilidad de transmisión de otras enfermedades (John 1997).

Un tratamiento completo post-exposición, usando inoculaciones de tejido nervioso, involucra una prolongada y dolorosa inmunización de 14 a 23 inyecciones. La OMS no lo recomienda como esquema de inmunización preventivo. En términos de protección o potencia, estas vacunas son inferiores a las derivadas de células. (WHO 2002).

En 1950, en los intentos de eliminar los accidentes neuroparalíticos relacionados con la desmielinización progresiva, se cultiva el virus en embrión de pato (Gluck *et al* 1984, Dressen 1997). Con esta nueva vacuna se inicia la segunda generación de vacunas (Loza-Rubio y Gómez-Lin 2004), la cual llega a ser ampliamente usada en Norte América en el tratamiento de las post exposiciones al virus de la rabia (Fu 1997). Fue elaborada a partir de las cepas originadas en embrión de pollo Chick Embryo Origin (CEO) de alto y bajo pasaje (LEP y HEP), de la cepa Flury de rabia. Este tipo de vacuna fue un avance significativo sobre las de tejido nervioso, al estar libre del factor encéfalo patogénico, sin embargo, al contener proteínas extrañas y lípidos, en algunas ocasiones, causaban reacciones locales y sistémicas, en especial en sujetos alérgicos a las proteínas del huevo. Además, la potencia de este tipo de vacuna no era todo lo deseable (Lavender *et al* 1971). Esta vacuna no ha estado disponible en Estados Unidos desde 1981, cuando se dejó de usar por causar reacciones alérgicas y febriles, las que ocurrían frecuentemente, debido a la presencia de algunas enzimas de neuraminidasa que degradaban los tejidos del paciente. (Kuwahara *et al* 1978). Se reportaron algunos casos de complicaciones neurológicas e inclusive dos muertes (Jackson *et al* 2000).

Una nueva vacuna purificada de embrión de pato (Purified Chick Embryo Cell rabies vaccine) PCECV, se puso en uso en Estados Unidos, se elabora a partir del virus inactivado de la cepa Flury LEP-25. Esta vacuna no muestra importantes diferencias clínicas con la vacuna de células diploides humanas (Lavender y Van Frank 1971)

La necesidad de controlar la rabia entre las poblaciones de animales domésticos, llevo a la medicina veterinaria a desarrollar a partir de las experiencias alcanzadas en la vacunación profiláctica practicada en el hombre al desarrollo de su propia tecnología. Varias cepas del virus de rabia se han propuesto para la producción de vacunas destinadas a uso veterinario. En 1927 en la Primera Conferencia Internacional de Rabia se propone que el virus dichas vacunas debe ser completamente inactivado, con la finalidad de no causar la enfermedad en los perros (Jackson *et al* 2000), debido a que en los primeros tipos de vacunas, a menudo se observaban reacciones de tipo neurológico después de la aplicación de la vacuna (WHO 1996, Ohmori *et al* 2002).

Para evitar este tipo de complicaciones, fueron usadas las vacunas adaptadas al embrión de pollo a partir de la cepa Flury, de alto y bajo pasaje (LEP y HEP), aquellas producidas entre los 40 y 50 pases (LEP) ocasionalmente causaban rabia en cachorros, gatos y bovinos (Bellinger *et al* 1983). El uso de la cepa Flury de HEP fue seguro para ser aplicado en gatos, bovinos así como en cachorros de tres meses (National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. (NASPHV) 2005).

En 1949, Enders, Robbins y Weller lograron cultivos de virus en células humanas o de monos (Salyers *et al* 2001).

Los primeros éxitos en la elaboración de vacunas de rabia a partir de cultivos celulares los obtuvieron Tadeo Witkor, Hilary Koprowski y sus colaboradores, en el Instituto Wistar de Filadelfia, al cultivar células humanas (Human Diploid Cell Vaccine) HDCV con virus cepa Pitman Moore L503, (Fu 1997, Dressen 1997), fue introducida al mercado en 1967 y considerada como el estándar dorado de las vacunas de rabia. La HDCV muestra una rápida respuesta de anticuerpos (Anderson *et al* 1976), de igual forma, responde a la revacunación o refuerzo (Rosanoff *et al* 1979), produce anticuerpos 19 días después de su inoculación, mientras que la vacuna tipo Semple, los produce hasta los 30 días después de la inoculación. (Fu 1997).

Cuando se compara con la vacuna de embrión de pato, la de HDCV resulta superior en cuanto a potencia y en la reducción en el tipo de reacciones desagradables, sin estar exenta a accidentes, debido a los componentes que

contiene el medio de cultivo, como trazas de suero bovino, polimixina, neomicina y thimerosal, con la posibilidad de reacciones alérgicas en individuos sensibles a estas sustancias. (Dennehy 2001) Varias experiencias positivas de este tipo de inoculaciones se han documentado, así como las ventajas sobre la vacuna de embrión de pato (Cabasso *et al* 1974, Anderson *et al* 1980).

Baer a finales de la década de 1960 reveló que era posible inmunizar a los zorros contra de la rabia por vía oral, con la finalidad de controlar la rabia en la fauna silvestre de EUA y Canadá empleando para ello cepas mutantes del virus de la rabia, hasta obtener las llamadas cepas SAG1, y SAG2 (WHO 1996, Artois *et al* 1997) la primera presenta un residuo de serina en la posición 333 de la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína y la SAG2 que es una delección mutante de la cepa SAD-Bern, la cual contiene un glutamato en la posición 333 de la glicoproteína y dos diferentes nucleótidos en el codon de la posición 333. Lo que reduce la posibilidad de reversión en su patogenicidad (Bruyère *et al* 2000, Hanlon *et al* 2002).

Con la finalidad de reducir costos, ya que las vacunas de líneas celulares diploides humanas (HDCV) son costosas debido a la necesidad de aplicar procedimientos adicionales que aumenten la baja multiplicación viral, se usaron diversos sistemas celulares de cultivo (biorreactores, agitadores magnéticos, etc.) y el desarrollo de otras líneas celulares, como la línea celular Vero, que ya había sido establecida en 1962 partiendo de un cultivo primario de células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aetipus*) e inicialmente usada en la vacuna contra la poliomielitis. Para la producción de la vacuna antirrábica se uso la cepa Pitman-Moore después de adaptarla al crecimiento en este tipo de células (WHO 1966, Paolazzi *et al* 1999). Estudios clínicos muestran una respuesta de anticuerpos después de una primera y segunda vacunaciones, comparable a la obtenida con las vacunas de células diploides humanas (WHO). Este tipo de línea celular Vero puede ser cultivada en suspensión, utilizando biofermentadores, lo que permite un mayor volumen de vacuna y, en consecuencia, abatir los costos de producción, con lo que permite su mayor uso, mostrando características comparables con las de células diploides (Kitala *et al* 1990). Es la que más se usa en México, eliminando de la práctica médica a la HDCV, que usan varios países (Loza-Rubio y Gómez-Lim 2004).

Desde 1958, en que el virus de la rabia fue adaptado a crecer en células de riñón de hámster considerables progresos se han realizado, lo que ha permitido un importante avance en la llamada segunda generación de vacunas. En el ámbito veterinario se desarrollaron vacunas inactivadas y de virus vivo modificado, las que por lo general utilizan cepas como ERA, Flury, SAD, las que se desarrollan en diferentes sustratos celulares, las técnicas de producción por lo general son simples, lo que permiten utilizar un menor número de células, así como reducir el volumen si se compara con las vacunas inactivadas, (WHO 1966) como desventajas se puede mencionar que poseen cierto poder patógeno, el cual varía con la especie animal, dosis y la vía de inoculación, por lo que no deben usarse en cachorros, gatos y animales en pobre estado de salud (Meyer *et al* 2001) y deben mantener una cadena fría para evitar probables fallas vacunales.

Las vacunas inactivadas se elaboran a partir de las cepas de rabia CVS-¹¹ FM y se desarrollan en diferentes sustratos celulares, estas han demostrado ser muy seguras, y altamente efectivas en las campañas masivas de vacunación (Kongkaew *et al* 2004, Secretaría de Salud México). Por lo general para los perros se usa hidróxido de aluminio como adyuvante el que puede causar lesiones en animales susceptibles (Carroll *et al* 2002).

En 1984, Barth y sus colegas desarrollan una vacuna en fibroblastos de pollo (PCECV Rabipur) a partir de la cepa Flury del virus de rabia, el cual es inactivado con BPL y se purifica mediante centrifugación zonal. Los métodos de cultivo de esta vacuna permiten la mayor producción y el abatimiento de costos (Paolazzi *et al* 1999).

La potencia de todas las vacunas derivadas de células es contrastada usando las pruebas de los Institutos Nacionales de Salud, los cuales siguen las normas de WHO que requiere una potencia de cuando menos 2.5 IU por dosis intramuscular (WHO 1996).

Las vacunas clásicas se han basado en el uso de patógenos completos inactivados, o bien aquellos que se les ha modificando su virulencia, procurando que conserven su inmunogenicidad, de igual forma, se han usado variantes del agente causal, o de su patogenicidad (Mackay *et al* 2001). Con

este tipo de biológicos se han erradicado o controlado numerosas enfermedades del hombre y de los animales. Sin embargo, ciertas vacunas presentan problemas, algunas de seguridad y otras de ineficacia (Palese *et al* 1996).

Una nueva era se inicia, cuando en 1962 se da a conocer el primer reporte de transfección exitosa de células *in vivo* seguida de la inyección de ADN purificado. Atanasiu reportó que la inoculación del DNA del virus del poliovirus generaba anticuerpos en contra de dicho virus (Chattergoon *et al* 1997).

Con los descubrimientos genéticos, se pueden producir vacunas cambiando las condiciones del agente infeccioso, mediante la ingeniería genética, al modificar el genoma (Palese *et al* 1996). Estas vacunas tienden a incluir en su composición solo aquellos inmunógenos que inducen una respuesta inmune protectora (Gurunathan *et al* 2000).

Las vacunas de ingeniería genética contra la rabia

Las primeras tendencias en la producción de vacunas génicas de rabia se dirigen a la utilización de virus recombinantes de plantas y animales como son Orthopoxvirus, Baculovirus, y Adenovirus. Los adenovirus humanos y animales son lo suficientemente grandes para acomodar genes extraños. Otras vacunas de tipo recombinante usan bacterias como BCG Mycobacteria, candidato potencial para elaborar vacunas contra la rabia. (WHO1992).

La primera vacuna recombinante que mostró la capacidad de inducir anticuerpos contra la rabia, utilizó la cepa Copenhagen del virus de la vaccinia, la cual tiene insertado en el gen de la timidin cinasa el gen de la proteína G del virus de la rabia (Paeoleti 1996). Después de amplios estudios la vacuna fue utilizada para el control de la rabia en mapaches y otros carnívoros que fueron vacunados oralmente en animales silvestres en Europa y Norte América, esta es la única vacuna de este tipo que ha sido usada extensivamente para el control de rabia en animales silvestres (Rupprecht *et al* 2004).

El poxvirus de la viruela del canario, ha sido utilizado para expresar dos proteínas importantes del virus de la rabia, la G y la N, y se consideró para la producción de vacuna de rabia para la inmunización de animales, aunque la purificación de proteína N resultó complicada y costosa. (WHO 1992).

En EUA, se aprobó el uso en gatos de una vacuna recombinante, utilizando el pox virus del canario que expresa la glicoproteína del virus de la rabia como una parte de su estructura (Paoletti 1996, Jackson *et al* 2000).

En el campo veterinario, la vacuna antirrábica de este tipo más utilizada es la vacuna oral, que se emplea en Europa, Canadá y EUA para el control de rabia entre la fauna silvestre.

Se emplea con éxito la vacunación oral con las vacunas Raboral V-RG (virus recombinante de vaccinia que expresa la proteína G), y con Rabigen SAG 2 un virus con mutaciones en la proteína G (Paoletti 1996, Kieny *et al*, 1984).

Numerosos estudios se han realizado en modelos murinos para evaluar el potencial de este tipo de vacunas, algunos utilizando la "pistola génica", (*gen gun*), como una vía de inoculación (Lodmell *et al* 1998).

Las tendencias en la producción de vacunas de ADN desnudo se orientan a las que contengan un vector expresando el gen de la glicoproteína del virus de la rabia. Éstas se encuentran entre las vacunas más modernas. El ADN desnudo persiste sin incorporarse al genoma de la célula (Gurunathan *et al* 2000). Con este tipo de vacunas, se ha demostrado que se activan las células CD8⁺ citolíticas, así como las CD4⁺ (Desmézieres *et al* 1999), al igual que anticuerpos (Lodmell *et al* 2000).

La respuesta inmune de las vacunas de ADN, es muy similar a las vacunas vivas atenuadas, o superior a las vacunas muertas o de subunidades de proteína. La respuesta humoral, (anticuerpos y memoria) es similar entre las tres, las diferencias se marcan en el tipo celular.

Las vacunas muertas o de subunidades de proteína no desarrollan inmunidad celular, en tanto que las vacunas de ADN muestran una mejor respuesta de CD4⁺ que las vacunas vivas atenuadas. Mientras que la respuesta tipo CD8⁺ es superior en las vacunas vivas atenuadas comparadas con las vacunas de ADN, siendo nula en las vacunas muertas o de subunidades de proteína. Esto se debe al tipo de presentación del antígeno al Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) por parte de las células especializadas a los linfocitos T y B (Gurunathan *et al* 2000).

Las vacunas de ADN desnudo tienen numerosas ventajas sobre las llamadas tradicionales; entre las que destacan: bioseguridad (Babiuk *et al* 2000);

respuesta de tipo celular y humoral (Gordon 2001). Además, en lugar de contener al agente infeccioso (atenuado, muerto o proteínas del mismo), están constituidas por pequeños anillos de doble cadena o plásmidos producidos en gran escala en bacterias incapaces de producir una infección (Fodor *et al* 2000).

Con las vacunas de ADN, los antígenos requeridos para estimular el sistema inmune son producidos por el huésped después de que el ADN penetra en el núcleo de una célula del individuo vacunado, sin que se incorpore al genoma de sus células. Los genes extraños son copiados en ARNm, los cuales son subsecuentemente traducidos en proteínas en el citoplasma (Whitton *et al* 1999). Los antígenos así producidos se presentan al sistema inmune en dos maneras: emergen de las células y son detectados, procesados y presentados por el sistema inmune a moléculas asociadas al complejo principal de histocompatibilidad (CPH) clase I, o son secretados y presentados en la membrana celular como moléculas del CPH clase II (Gurunathan *et al* 2000).

Así, una vacuna de este tipo genera una respuesta inmune muy completa, que se asemeja mucho a una infección natural y que no se obtiene con las vacunas convencionales, sobre todo con las de microorganismos muertos tabla 2 (Babiuk *et al* 2000).

La respuesta se incrementa si se usan los llamados adyuvantes (del latín *adjuvar* ayudar), estos son un grupo heterogéneo de compuestos usados para despertar o incrementar una respuesta inmune, muchas moléculas tienen esta propiedad (Schijns 2000).

Tabla 2 Respuesta inmune inducida por diferentes tipos de inmunógenos

	Vivas o atenuadas	Virus muerto	Recombinantes	Vacunas DNA
Células B	+++	+++	++	++
Células T CD4 ⁺	+/- Th1	+++ Th1	+	+/- Th1
Células T CD8 ⁺	+++	-	+++	++
Moléculas MHC	I y II	II	I y II	I y II

(Gurunathan S. *et al* 2000).

Tradicionalmente se han clasificado en: a) vegetales, como la saponina; b) bacterianos, como monofosforil lípido A, la toxina del cólera, los lipopolisacáridos y sus derivados; c) derivados químicos, como el hidróxido de aluminio en diferentes formas (Schijns 2000); y más recientemente se han incluido los llamados adyuvantes génicos (Mutwiri *et al* 2002).

En la clasificación de los adyuvantes, los denominados motivos CpG se encuentran agrupados en los elementos estructurales de microorganismos, que actúan dentro del organismo enviando una señal de peligro. Éstos incluyen a los lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas bacterianas, peptidoglicano, todos ellos abundantes en las bacterias pero no en las células eucariotas (Schijns 2002), los cuales se han usado para modular la respuesta inmune e influir en el balance entre anticuerpos y la inmunidad mediada por células (Scheerlink 2001, Hunter 2002).

Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método de análisis del fenotipo de las poblaciones celulares, fue desarrollada en los principios de la década de 1970 con la finalidad de facilitar la separación de las células contenidas en una suspensión y permitir el desarrollo de estudios de subpoblaciones de linfocitos (Abbas *et al* 2004).

Para el desarrollo de la técnica se necesita un equipo especial, el citómetro de flujo, el que cuando está equipado con un sensor de fluorocromos se le denomina FACS o separador celular activado por fluorescencia (Regueiro *et al* 2002).

En los laboratorios clínicos, el uso de la citometría de flujo se ha incrementado notablemente, va más allá del recuento leucocitario. El estudio de los ciclos celulares en enfermos con cáncer utiliza la inmunofenotipificación de las células de la médula ósea como una valiosa herramienta de diagnóstico de leucemia (Kalina *et al* 2005), otra valiosa aplicación en la práctica médica es el monitoreo de los linfocitos CD4⁺ de pacientes con el síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, en la que es una valiosa herramienta en la medicina contemporánea (Pattanapanyasat *et al* 2005).

La citometría de flujo es utilizada ampliamente por las instituciones dedicadas a la investigación, sobre todo aquellos que estudian las características de las

células (tamaño, granularidad, antígenos que posee, propiedades eléctricas, entre otras) (Sohn *et al* 2000).

Estas mediciones se hacen mientras las células pasan, de una en una, entre un rayo láser y un detector fotoeléctrico, mientras estas pasan a través del rayo láser, el haz del rayo se desvía en diferentes grados, dependiendo del tamaño y de la complejidad granular de sus estructuras.

Cuando se hacen reaccionar a las células con anticuerpos (marcados con fluorocromos) dirigidos contra antígenos particulares, es posible identificar subpoblaciones celulares (linfocitos B, CD 4⁺ o CD 8⁺) mediante la excitación de la molécula del fluorocromo usado (verde para la fluoresceína y rojo para la ficoeritrina). Los cambios en la dirección y en la intensidad de la luz láser son después transformados en señales electrónicas que finalmente son digitalizadas. De esta manera se generan imágenes que permiten ver en el monitor del aparato los parámetros medidos.

Al seleccionar una región (ventana) es posible estudiar la ventana de los linfocitos CD 4⁺ y establecer mediciones que permitan por ejemplo, determinar porcentajes de dichas células en una muestra dada (Rojas-Espinosa 2001).

Justificación

En el año de 2004 en México se reportaron dos casos de rabia, de enero a mayo de 2005 no se reportan casos, al parecer la rabia transmitida por perros, en nuestro país se encuentra bajo control, en Canadá, EUA los casos de rabia humana son debidos a la fauna silvestre, en Europa la rabia transmitida por murciélagos, a hecho que este padecimiento sea considerado como una enfermedad emergente. Lo que supone que los casos de rabia en nuestro país el murciélago vampiro pueda ser uno de los vectores principales de esta enfermedad.

El trabajar con vacunas con virus atenuados, existe el riesgo potencial de producir la enfermedad, en el caso de las vacunas inactivadas, se requiere la aplicación de dosis anuales para asegurar que la protección sea completa, las vacunas generadas con la tecnología del ADN muestran ventajas sobre las anteriores, al utilizar un plásmido que expresa el gen que codifica una sola proteína, eliminando así el peligro de producir la enfermedad. La proteína G del virus de la rabia, que es el encargado de la producción de los anticuerpos protectores.

En este trabajo se utilizó un plásmido que codifica para la proteína G del virus de la rabia de un murciélago hematófago *D. rotundus*. Si bien se ha demostrado que las diferentes cepas de vacuna antirrábica protegen adecuadamente contra un virus patógeno, sin importar la procedencia de uno o la otra (Bahlou *et al* 1998), se recomienda utilizar virus homólogo en los brotes de rabia.

Determinar la respuesta celular, es de importancia crítica para evaluar la eficacia de las nuevas vacunas en especial aquellas que se adaptan a las necesidades del país.

Hipótesis

En ratones inoculados con una vacuna antirrábica de ADN desnudo que exprese la proteína G, se presentara proliferación de células T CD4⁺ y T CD8⁺ en el bazo.

Objetivo general

Determinar la proliferación celular de linfocitos T de bazos de ratones inoculados con una vacuna antirrábica de ADN desnudo.

Objetivos particulares

- 1.- Determinar las variaciones en los porcentajes de células T CD4⁺ y T CD8⁺ en bazos de los ratones inoculados, con vacuna antirrábica de ADN desnudo, vacuna antirrábica de virus vivo modificado, mediante la citometría de flujo.
- 2.-Medir las variaciones del peso de los bazos de los ratones inoculados y los controles.
- 3.-Determinar la protección conferida por la vacuna de ADN desnudo al desafío con una variante de origen vampiro.

2. MATERIAL y MÉTODOS

Características del plásmido

El plásmido vacunal usado pCI-neogpVR (Aguilar *et al* 2005) contiene el gen que codifica para la glicoproteína de rabia, procedente de un murciélago hematófago *Desmodus rotundus* (aislado HQ01-IMSS) en el vector de expresión pCI-neo, (Promega Corporation, Madison, WI. EUA., catalogo No E1481) él cual es un vector comercial de expresión en células de mamífero que porta la región promotora del citomegalovirus humano, este permite la expresión constitutiva del gene clonado. Contiene también la señal de poliadenilación del virus SV40 y genes de resistencia a la neomicina en sistema de células eucariotas y a la ampicilina para células bacterianas.

Fase I Fase I Amplificación del plásmido de expresión

El plásmido vacunal fue propagado en la cepa bacteriana DH10B de *Escherichia coli*, la cual fue desarrollada en medio Luria Bertoni (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%), se cultivo previamente por 8hs. a 37° C, en agitación constante para iniciar la fase de crecimiento y después adicionarlo a 500 ml como volumen final de LB contenido en un matraz de 2 litros, él cual fue incubado por 14 -16 horas a 37° C, en agitación constante. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación 6000 g por 15 min., a 4° C.

Fase II purificación del plásmido

Para la purificación se utilizo el sistema comercial: "Endofree Plasmid Giga Kit" (Quiagen®) EUA. Siguiendo las instrucciones del fabricante.

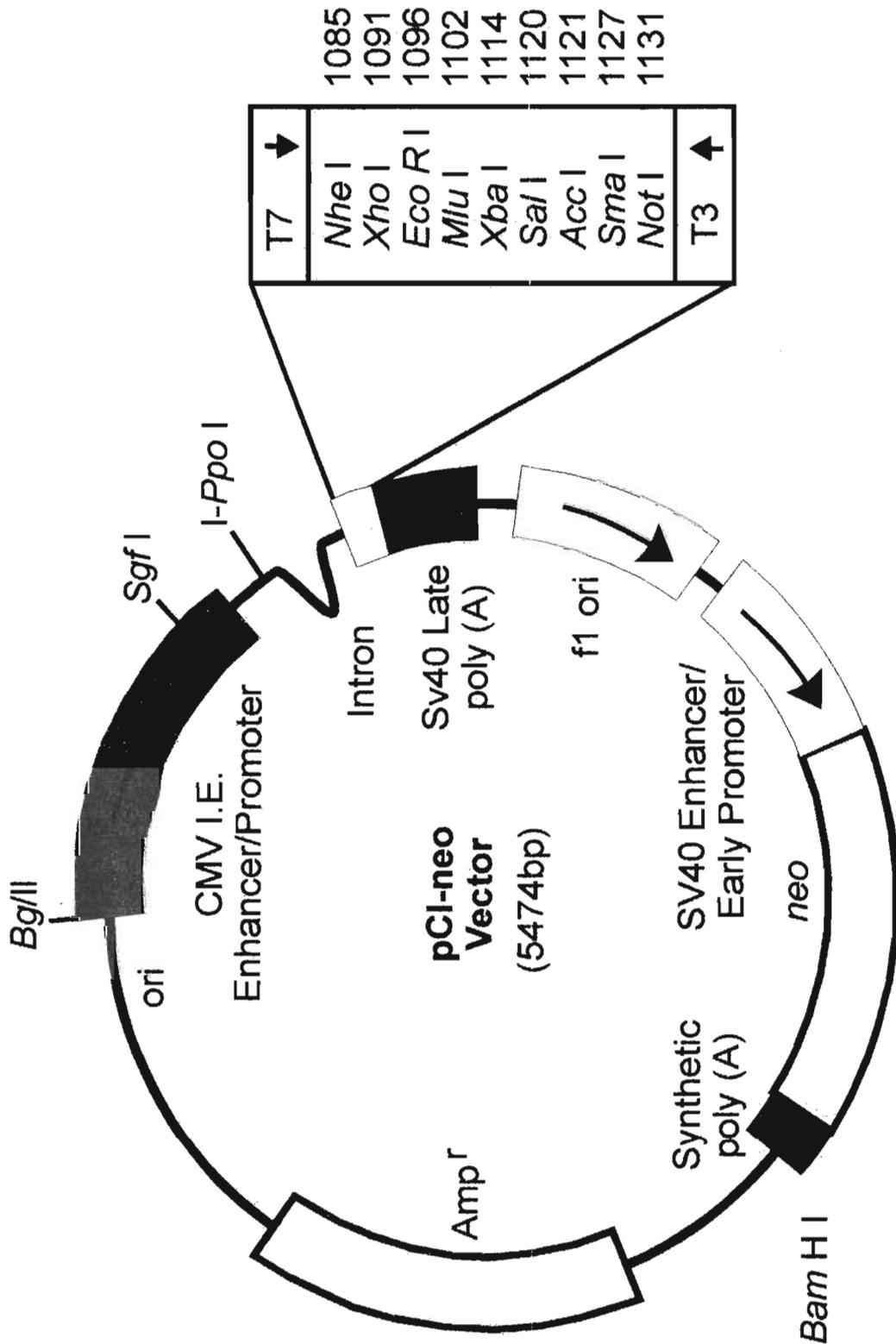
Fase III Electroforesis en gel de agarosa

Fase IV Prueba de inmunogenicidad en ratones

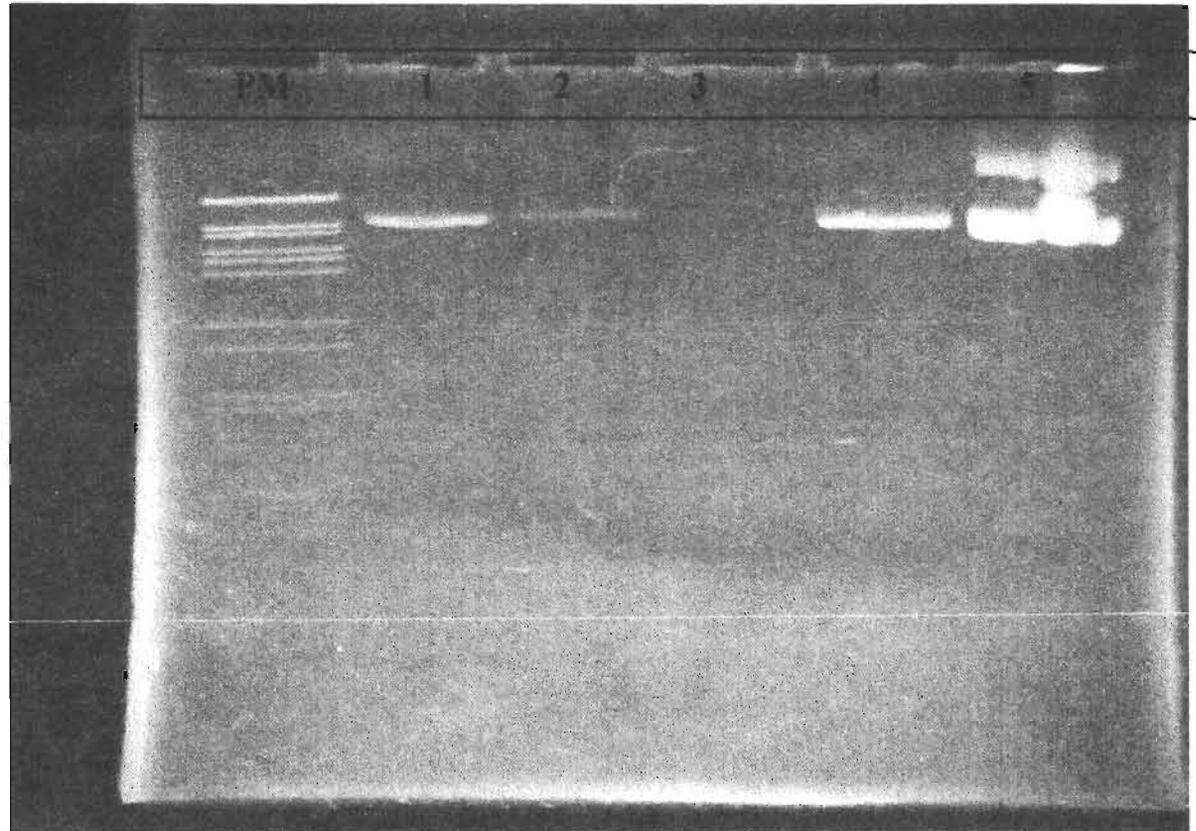
El plásmido vacunal obtenido, fue inoculado en el músculo tibial anterior de ratones BALB/c a la dosis de 50 µg por animal, diluido en agua de inyección.

El adyuvante génico (CpG's), que se uso (Jorgensen *et al* 2003) se mando sintetizar a una casa comercial con una secuencia de bases de: ACCGATGTCGTTGCCGGTGACG, con enlace fosfotioato en las primeras bases 5'-3'. El cual se diluyo en agua de inyección de acuerdo a la concentración sugerida por el fabricante y se adiciono al inoculo (pCI-neogpVR+CpG's), utilizando una dosis de 30 µg por ratón.

Características del vector de expresión pCI-neo



DNA del plásmido Neo utilizado como vacuna génica



Carril 1 Marcador, 1 lisado, 2 filtrado, 3 lavado, 4 elución, 5 purificación

Se formaron dos grupos uno de desafío y el de proliferación de células:

En el grupo de proliferación se usaron 50 hembras BALB/c (6-8 semanas de edad) donados por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, los cuales fueron distribuidos al azar en 5 grupos experimentales. Los animales fueron alojados en jaulas convencionales y recibieron agua y alimento *ad libitum*.

Diseño experimental

Grupo	No. de ratones
1.-Agua de inyección 100 µl. (testigo)	5
2.-Vacuna Comercial 250 µl	15
3.- Plásmido pCI-neogpVR solo 50µg en 100 µl	15
4.- Adyuvante CpG's 30µg CpG's en 100 µl	15
5.-Plásmido pCI-neogpVR 50µg + 30µg CpG's en 100 µl.	15

Fase V Determinación de la proliferación de células T CD4⁺ y T CD8⁺ Obtención de las muestras:

Después de la inoculación y con la finalidad de determinar la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ mediante la citometría de flujo. Se sacrificaron por dislocación cervical, un testigo y tres ratones de cada uno de los subgrupos a los diferentes días posinoculación: día 1, 4, 7, 15 y 30.

Cada uno de los animales fue pesado en una balanza analítica, se le extrajo el bazo, eliminando el tejido conjuntivo y la grasa, el órgano se pesó, para calcular la relación del peso del bazo con respecto al peso del ratón, obteniendo así el valor del índice esplénico.

El bazo fue disgregado, utilizando una malla de tela de organza previamente esterilizada. Las suspensiones celulares obtenidas, tanto de los animales testigo como los vacunados fueron lavadas dos veces con PBS-azida de sodio 0.01% frío y centrifugadas a 1500 x g.

Se resuspendieron las células en 1000 µl.de PBS-azida de sodio 0.01% frío y fueron contadas en una solución 1:10 de azul de tripán en una cámara de

Newbauer para obtener tres alícuotas que contenían 1.5×10^6 células, las cuales fueron depositadas en tres tubos Ependorf diferentes, cada uno de los cuales contenía 100 μ l. PBS-azida de sodio 0.01% frío.

A uno de los tubos se le adiciona los anticuerpos marcados anti-CD4⁺, a otro se adiciona los anticuerpos anti-CD8⁺, (Caltag Laboratories Burlingame, CA. USA) y el tercero sirvió como control durante la lectura en el citómetro. Las tres muestras se incubaron por 20 minutos en hielo. Se lavaron con 1000 μ l PBS-azida frío 0.01% centrifugando por un minuto a 3000 x g por tres ocasiones.

Finalmente se resuspendieron en 500 μ l. de PBS 1% de paraformaldehído y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest versión 2.0.

En el diagrama de puntos de tamaño contra granularidad se delimitó la región correspondiente a las células linfoides y se adquirieron 10,000 eventos en dicha región. Los resultados fueron expresados en porcentajes de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

Fase VI Desafío

Diseño experimental

Grupo	No. de ratones
1.-Agua de inyección 100 μ l.	9
2.-Vacuna Comercial 250 μ l.	9
3.-Plásmido pCI-neogpVR solo 50 μ g en 100 μ l.	9
4.-Adyuvante CpG's 30 μ g en 100 μ l.	9
5.-Plásmido pCI-neogpVR 50 μ g + 30 μ g CpG's en 100 μ l.	9

Con el objeto de probar la capacidad de la vacuna génica para conferir protección contra la rabia, los ratones vacunados y controles fueron desafiados con un virus de origen vampiro que contenía entre 50-100 DL 50% 90 días después de la vacunación. Esto se realizó después de titular un virus de rabia de origen vampiro, de acuerdo al método de Read and Muench (WHO 1996)

Análisis Estadístico

Los resultados de la prueba de citometría de flujo fueron expresados como el promedio y el error estándar. Las diferencias entre los ratones de cada grupo se analizaron mediante la prueba de t de Student. Una $P < 0.05$ fue considerada como significativa, para lo cual se utilizó el programa Sigma Stat versión 3.1.

3. RESULTADOS

Se obtuvo 10.3 mg totales de plásmido para inocular los ratones utilizados en este trabajo. La calidad de las bandas se observa en la figura 1.

Los resultados de la prueba de inmunogenicidad en ratones se muestran en las gráficas siguientes.

En la gráfica 1, se muestra el promedio del índice esplénico de los animales objeto de este estudio, se puede apreciar que en el día uno este índice es significativamente menor entre el testigo y los animales inoculados con pCI-neogpVR +CpGS, sin observar diferencias significativas entre otros tratamientos, comportándose de manera similar al testigo y entre ellos.

En los días 4, 7 y 15 posinoculación, no se observaron diferencias significativas entre los promedio del índice esplénico de los animales de los diferentes tratamientos, comportándose de manera similar al testigo y entre ellos.

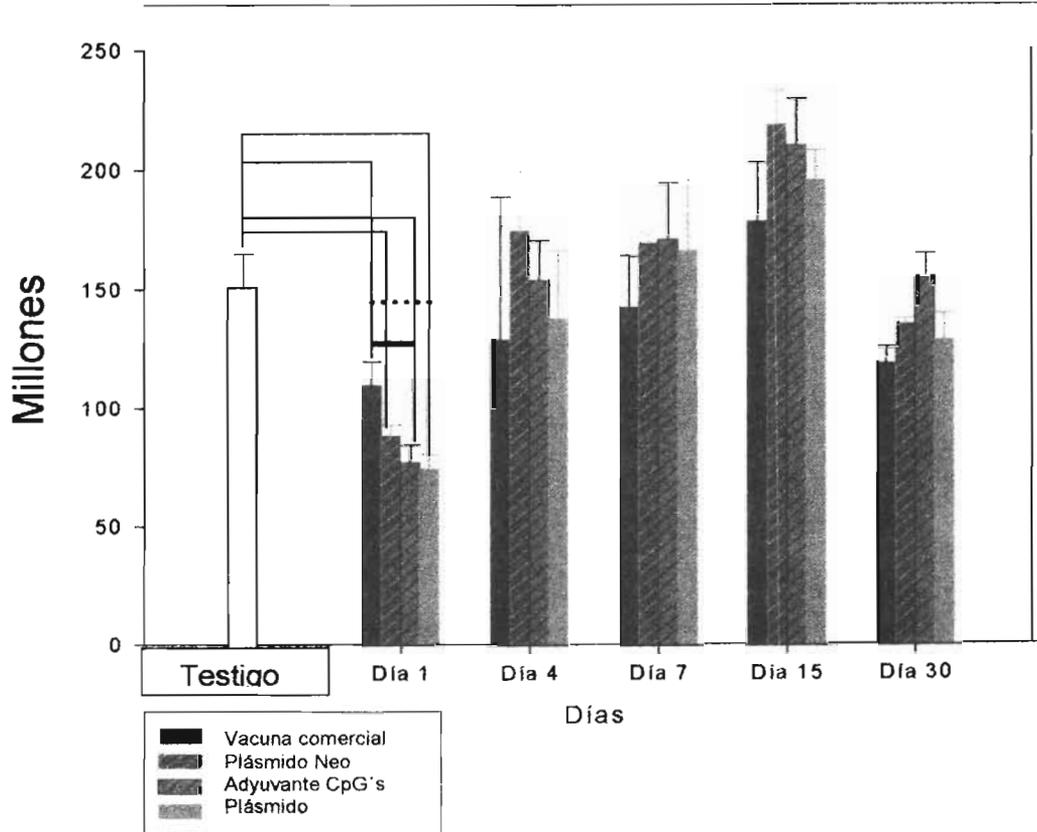
En el día 30 se observan índices significativamente menores ($p < 0.05$) entre el testigo, la vacuna comercial y pCI-neogpVR cuando estos, se comparan con pCI-neogpVR +CpGS. El índice esplénico del grupo pCI-neogpVR es significativamente menor ($p < 0.05$) cuando se compara contra el testigo. No se observaron diferencias significativas entre los promedio del índice esplénico de los animales de los diferentes tratamientos, comportándose de manera similar al testigo y entre ellos.

En la gráfica 2, se pueden apreciar en el primer día, la disminución significativa ($p < 0.05$) en el número de células de los cuatro grupos comparado con el testigo. Así como la disminución significativa de células totales ($p < 0.05$) de los grupos inoculados con el adyuvante CpG's y pCI-neogpVR+CpG's cuando es comparado con la vacuna comercial.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos restantes.

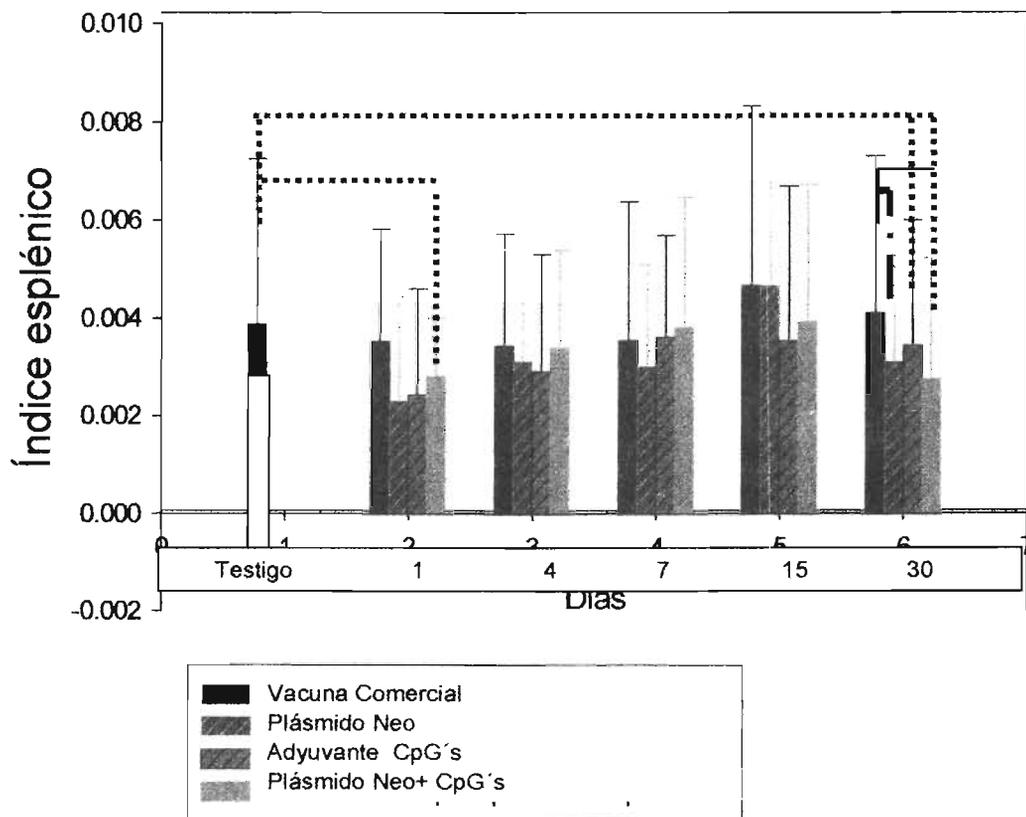
No se observaron diferencias significativas entre los conteos de células totales de los animales de los cuatro tratamientos, comportándose de manera similar al testigo y entre ellos, durante los días siguientes (4, 7, 15, 30) objeto del presente estudio.

En la gráfica 3, se puede observar, el promedio de los porcentajes de linfocitos T CD4⁺. En el día uno, no existen diferencias significativas entre el grupo testigo y



Gráfica 1 proliferación de células en el bazo de ratones Balb/c como resultado de la inoculación de los tratamientos objeto de éste trabajo.

Se muestran los errores estándar y las diferencias significativas entre el testigo y los grupos.



Gráfica 2 índice esplénico de ratones Balb/c como resultado de la inoculación de los tratamientos objeto de éste trabajo. Se muestran los errores estándar y las diferencias significativas entre el testigo y los grupos.

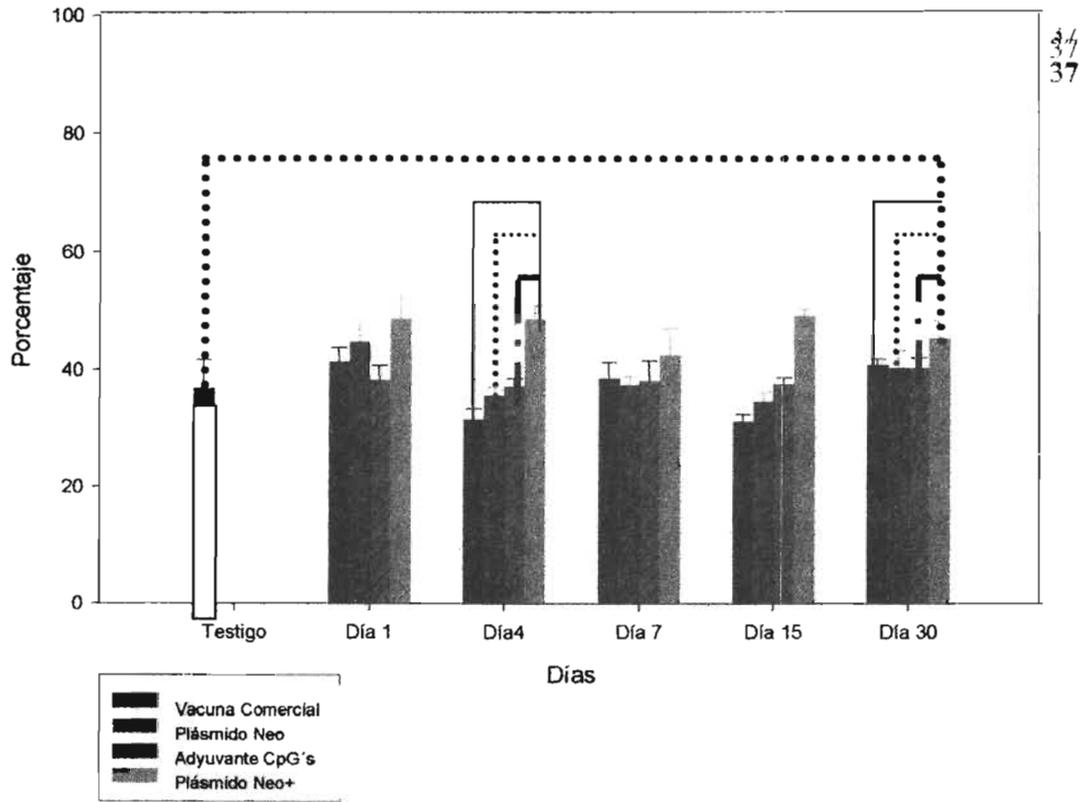
los cuatro tratamientos, ni entre ellos. En el día 4 se observa diferencia $p < 0.001$ entre los grupos pCI-neogpVR (35.67%) contra pCI-neogpVR +CpG's (48.57%) y las diferencias significativas $p < 0.05$ entre los grupos CpG's (37.15%) contra pCI-neogpVR +CpG's, así como el testigo contra pCI-neogpVR +CpG's. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo testigo y los otros tratamientos. En el día 7 no se observan diferencias significativas entre el grupo testigo y entre los cuatro grupos.

En el día 15, se observó el aumento significativo (49.17%) del grupo pCI-neogpVR+CpG's comparado contra el testigo, así como contra los grupos CpG's (37.48%), vacuna comercial (31.2%) y con pCI-neogpVR (34.67%).

En el día 30 posinoculación, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ obtenidos del bazo de los animales de los diferentes tratamientos, comportándose de manera similar al testigo y entre ellos.

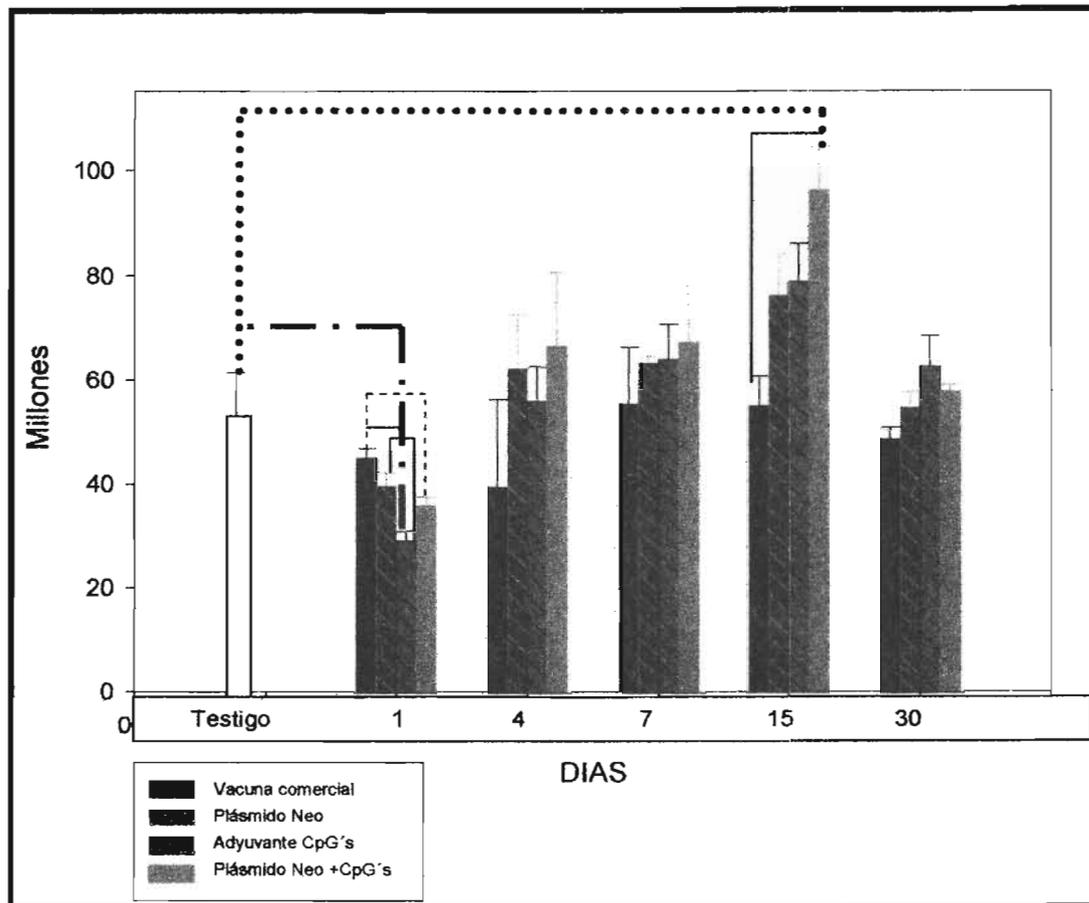
En la gráfica 4 se muestran los resultados del calculo del número absoluto de células T CD4⁺ obtenidos del bazo, en el día uno se encuentran diferencias significativas $p < 0.05$ del grupo inoculado con vacuna comercial, quien tiene mayor número de células que el grupo pCI-neogpVR+CpG's y el grupo CpG's. El testigo muestra diferencias significativas al tener mayor número de células que el grupo inoculado con CpG's. El grupo pCI-neogpVR muestra diferencias significativas al tener mayor número de células cuando es comparado con el grupo CpG's.

No se encontraron otras diferencias significativas con las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ de los animales de los diferentes tratamientos comparadas con el testigo. En los días 4 y 7, no se encontraron diferencias significativas con las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ de los animales de los diferentes tratamientos comparadas con el testigo, ni entre ellos. En el día 15 se observo un aumento significativo en el número de linfocitos T CD4⁺ de los animales inoculados con el plásmido pCI-neogpVR +CpG's, con respecto a la vacuna comercial, así como el testigo, no se encontraron diferencias significativas con los animales de los diferentes tratamientos. En el día 30 posinoculación, no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ obtenidos de los bazos de los animales de los diferentes tratamieritos, comportándose de manera similar al testigo y entre ellos.



Gráfica 3 porcentaje de células T CD4⁺ de ratones Balb/c como resultado de la inoculación de los tratamientos objeto de este trabajo.

Se muestran los errores estándar y las diferencias significativas entre el testigo y los grupos.



Grafica 4 células T CD4⁺ absolutas de ratones Balb/c como resultado de la inoculación de los tratamientos objeto de éste trabajo.

Se muestran los errores estándar y las diferencias significativas entre el testigo y los grupos.

La grafica 5 corresponde al porcentaje de células T CD8⁺ obtenidas del bazo, en ella únicamente se observan diferencias significativas en el primer día después de la inoculación entre el porcentaje mayor del grupo pCI-neogpVR (16.46%) contra los grupos inoculados con vacuna comercial (13.56 %) y el grupo pCI-neogpVR +CpGS (13.69 %).

La gráfica 6 muestra el comportamiento del número absolutos de células T CD8⁺ obtenidas del bazo, en ella únicamente se observan diferencias significativas $p < 0.05$ en el primer día después de la inoculación entre los grupos de animales inoculados con vacuna comercial que tienen un mayor número de células con respecto a los grupos pCI-neogpVR y pCI-neogpVR +CpGS.

Desafió.

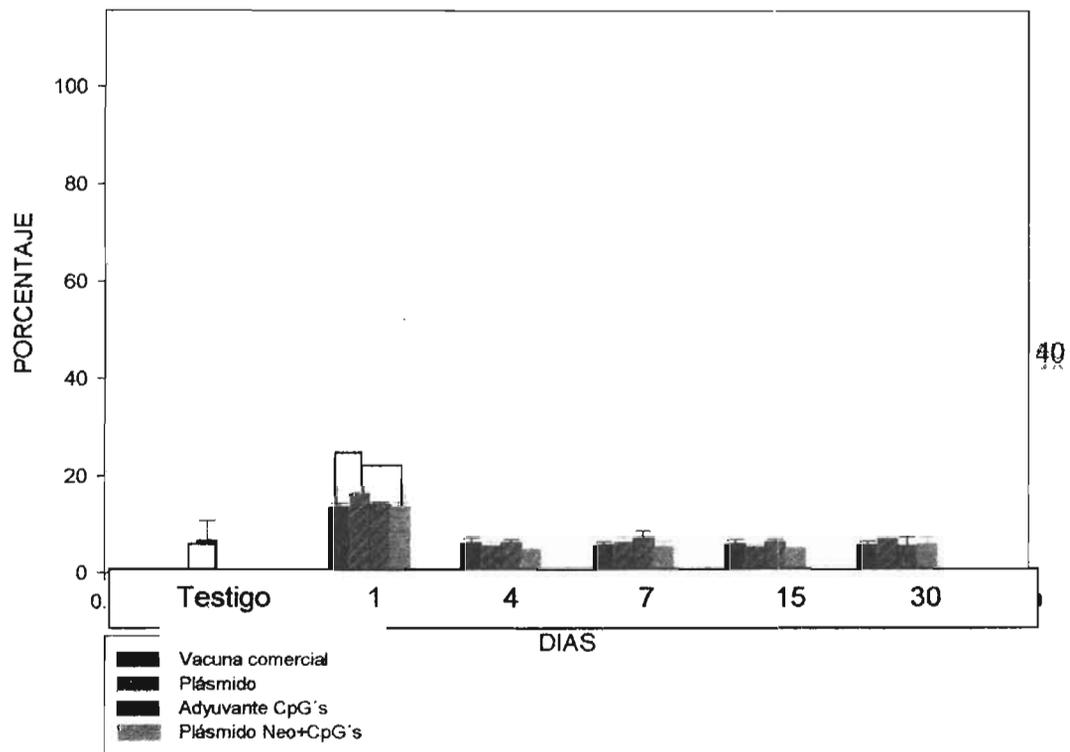
Del grupo de nueve animales vacunados con el plásmido pCI-neogpVR (grupo 3), tres de ellos fallecieron, la vacuna mostró una protección al desafío de 77.77 %; mientras que para el grupo 5 (pCI-neogpVR+CpG's), tres de ellos fallecieron, la vacuna mostró una protección al desafío de 77.77 %; del grupo 4 de nueve animales inoculados con el adyuvante CpG's todos murieron. En el grupo 2 de 9 ratones vacunados con 250 μ l de vacuna comercial, diez días después de la inoculación tres animales mostraron signos de parálisis y murieron. De seis animales sujetos a la prueba ninguno mostró signos de la enfermedad.

Se desafiaron animales testigo (grupo 1) presentaron 100 % de mortalidad a partir del día 8.

Resultado de la prueba de desafío, el plásmido pCI-neogpVR+CpG's mostró diferencias en el tiempo en que se iniciaron los signos de la enfermedad y la muerte. Mientras que para el grupo 3 plásmido pCI-neogpVR el primer animal murió en el día 9 posinoculación y el último el día 15, para Neo+ CpG's fue el día 12 y el último el día 22.

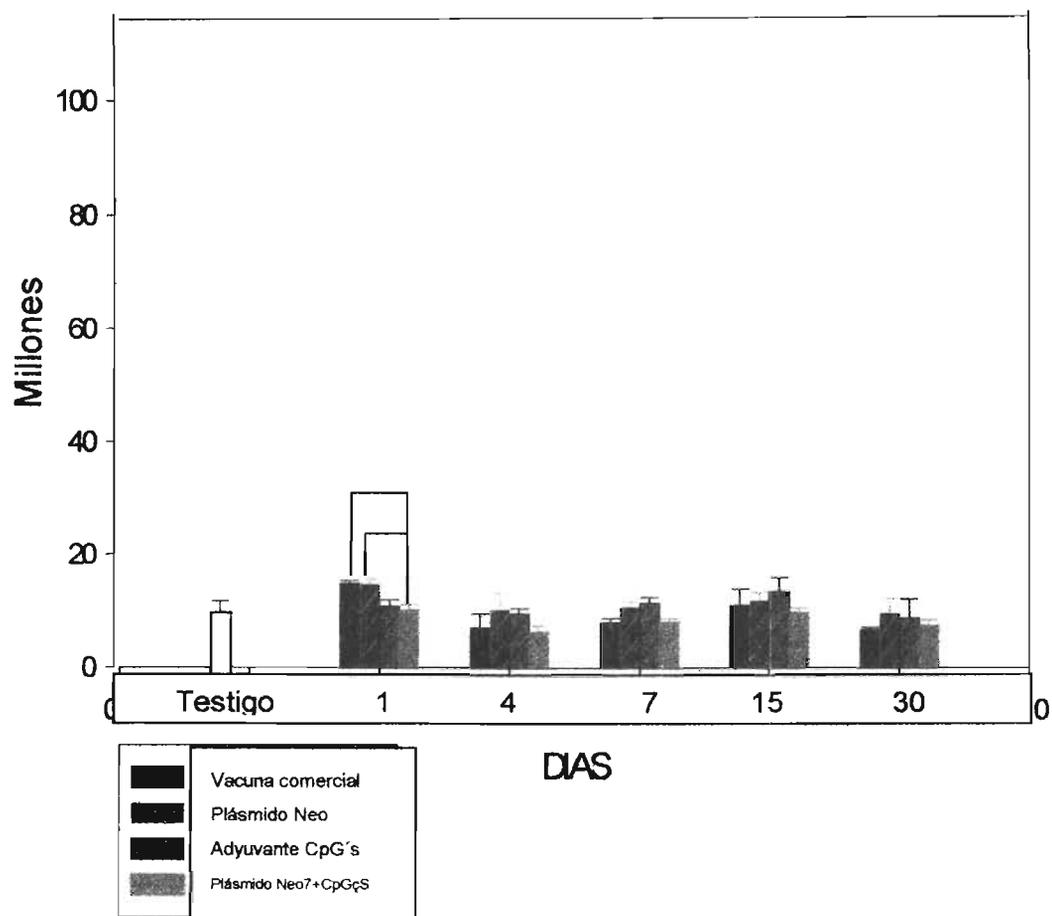
En la gráfica 8 se muestra el tiempo de mortalidad posterior al desafío para el grupo vacunado con pCI-neogpVR, fue de 12 días ± 3 ; mientras que para el grupo pCI-neogpVR+CpG's fue de 17 días ± 5 días. Esto sugiere un indicio de protección que no alcanzo a desarrollarse y los animales murieron.

Durante a la prueba de desafío, se tituló el virus que se utilizo, para llevarlo a cabo. Se obtuvieron los resultados esperados de entre 50-100 DL 50% en la dilución empleada al llevar a cabo el desafío.



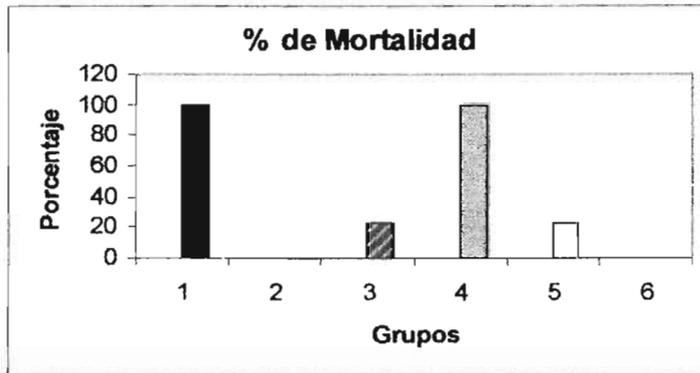
Grafica 5 porcentaje de células T CD8⁺ de ratones Balb/c como resultado de la inoculación de los tratamientos objeto de éste trabajo.

Se muestran los errores estándar y las diferencias significativas entre el testigo y los grupos.

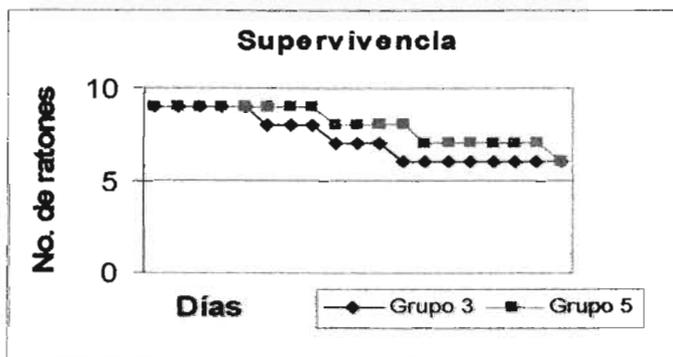


Grafica 6 células absolutas T CD8⁺ de ratones Balb/c como resultado de la inoculación de los tratamientos objeto de éste trabajo.

Se muestran los errores estándar y las diferencias significativas entre el testigo y los grupos.



Gráfica 7. Resultado de la prueba de desafío



Gráfica 8. Supervivencia de los ratones al final de la prueba de desafío

4. DISCUSION

Las vacunas de ADN desnudo, representan una nueva modalidad que puede superar algunos de los inconvenientes de las llamadas vacunas de segunda generación (Hellermann and Mohaparta 2003) estas vacunas génicas, además de ser seguras, confieren inmunidad de tipo humoral y celular, en rabia es de gran importancia debido a que estimulan o enfatizan la producción de anticuerpos (Perry & Lodmel 1991), varios investigadores han demostrado que sin la participación de células T CD4⁺ los ratones mueren, cuando estos son desafiados (Jakson *et al* 2000), demás del papel central que desempeñan los linfocitos T CD4⁺ en la homeostasis del sistema inmune (Gurunathan *et al* 2000), de ahí la importancia de estudiar el proceso de la inmunidad celular que confieren esta vacuna antirrábica de ADN, determinando las variaciones en los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en bazos de ratones inoculados con un plásmido que expresa la proteína G del virus de la rabia de la cepa HQ01-IMSS, la respuesta al efecto de un adyuvante génico (CpG's), su comparación con una vacuna comercial virus vivo modificado, así como la protección conferida por estas vacunas al desafío, ante una cepa de virus de la rabia de origen vampiro, con la finalidad de enfatizar esta respuesta utilizando, refuerzos mediante la reevaluación en el día más adecuado, (Ivory & Chade 2004) o bien el uso de variantes en el tipo de adyuvante.

La utilización de un kit comercial (Qiagen ®) para la extracción y purificación del plásmido, representa varias ventajas sobre las de fenol cloroformo algunas de estas son: 1) con esta metodología es posible reducir el tiempo de extracción y purificación a menos de la mitad. 2) se utiliza equipo sencillo, él cual es proporcionado por el fabricante, así como todos los reactivos necesarios para la obtención de ADN libre de endotoxinas, 3) no se trabaja con reactivos tóxicos como es el fenol 4) la cantidad de ADN obtenido es mayor utilizando esta técnica que con fenol cloroformo, se obtuvo un promedio de cinco mg/ml 5) la calidad de las bandas obtenidas, es similar al que se obtiene con fenol cloroformo.

Como desventajas se puede mencionar su costo, sin embargo el tiempo requerido y la cantidad de producto obtenido en relación con el tiempo del

investigador probablemente justifique su precio para realizar trabajos de investigación.

Si se desea la producción a escala comercial, el proceso de extracción y purificación del plásmido es sumamente costoso, laborioso y requiere de simplificación para que la vacuna génica sea competitiva. Una alternativa para obviar este proceso sería que la proteína G del virus de la rabia fuera expresado por plantas y que los productos así obtenidos se administraran a los animales. Hay varios trabajos que han demostrado la posibilidad de inmunizar a ratones a los que se les da a comer productos vegetales que expresen la proteína G del virus de la rabia.

Determinar la respuesta celular, es de importancia crítica en el estudio de la inmunidad de las enfermedades infecciosas, así como para evaluar la eficacia de las nuevas vacunas. La citometría de flujo permite identificar células T utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos (Chahroudi *et al* 2003). Se puede evaluar mediante la citometría de flujo (Nguyen 2003 *et al*). Sin embargo no en cualquier laboratorio es posible el desarrollo de la técnica, se necesita que el citómetro de flujo este equipado con un sensor de fluorocromos (FACS o separador celular activado por fluorescencia).

La función de las vacunas antirrábicas, es la inducción de anticuerpos neutralizantes y la activación de los linfocitos T CD4⁺, sin la inmunidad celular los tratamientos pos-exposición contra esta enfermedad resultan ineficaces (Celis *et al* 1988). Se ha demostrado que la depleción de linfocitos T CD4⁺ en los primeros 10 días después de la infección con virus de la rabia, resulta fatal para el ratón (Jackson *et al* 2000).

La determinación de las variaciones en los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en el bazo y sus productos, es una metodología utilizada con frecuencia cuando se estudia las respuestas de la inmunidad celular conferida por las vacunas génicas (Fonseca *et al* 2001, Pinto *et al* 2003), algunos autores después de extraídos las células totales del bazo las incuban para determinar la producción de interleucinas (Wang *et al* 2001).

En el estudio de enfermedades tales como la malaria, la determinación del índice esplénico, permite de una manera indirecta determinar la proliferación de

células en el bazo ante el estímulo de un antígeno (Acosta 2004). Debido a que en este órgano y en los nodulos linfáticos, es donde los linfocitos T responden a los antígenos que las células presentadoras de antígenos (APCs), han tomado de la periferia o de los tejidos infectados y han procesado y unido a moléculas del CPH para que sean reconocidos por los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Srivastava and Liu 2003, Abbas *et al* 2004). En este estudio, en ninguna etapa de su desarrollo se encontró esplenomegalia en los ratones objeto de la prueba, en la gráfica 1, para el día uno se observó un índice esplénico significativamente menor cuando se comparo entre el testigo y los animales inoculados con pCI-neogpVR +CpG's, es muy probable que sea debida a un efecto sinérgico del adyuvante y el plásmido usado, reportado en la literatura para otros plásmidos (Kusakabe *et al* 2000, Yiqiang and Krieg 2002), y que dicho estímulo, diera lugar a la salida de células APCs maduras e inmaduras y otras propias de la inmunidad innata que respondieron a una señal que es lo que induce el adyuvante de este tipo (Wagner 2001). En los otros tratamientos no se observó dicho efecto. Durante los días cuatro, siete, y 15 del desarrollo de la prueba, el índice esplénico fue similar al testigo y entre ellos, esto no quiere decir que las vacunas administradas no produjeran una respuesta, la proliferación de los linfocitos también se da en los nódulos regionales, que es el primer sitio donde las células dendríticas, migran después de la inoculación del plásmido (Johansson *et al* 2002).

La respuesta inmune, es modulada por una serie de citocinas IL-2, IL 4, IL10, IL12 en especial las producidas por los linfocitos T CD4⁺ que permiten controlar el proceso, evitando la sobre producción de células, la proliferación clonal solo dura unos pocos días, de ahí que en el día 30 se observan índices esplénicos significativamente menores entre el testigo y Neo+CpG's, así como con Neo y el grupo de ratones inoculados con la vacuna comercial, las células efectoras salen del bazo o entran en apoptosis y solo quedan las de memoria (Gordon 2001).

El adyuvante génico utilizado en el presente trabajo, no desarrollo esplenomegalia en los ratones inoculados (ver gráfica 1) no indujo la proliferación de células totales (ver gráfica 2), la disminución mostrada el día 1 probablemente se deba a que la mayoría de las células de la inmunidad innata,

monocitos, células NK y otras se encuentran fuera del bazo por el estímulo de los CpG's (Krieg *et al* 1998, Warren *et al* 2000), la secuencia CpG's usada en el trabajo, no estimuló la proliferación de T CD4⁺ (ver gráfica 3). El día después de la inoculación la disminución de T CD4⁺ (ver gráfica 4) posiblemente se deba a que algunas de estas células han abandonado el bazo.

En los animales inoculados con la vacuna comercial, los índices esplénicos de este grupo se encontraron dentro de la normalidad (ver gráfica 1), la respuesta muestra ligeras variaciones en el número total de células en bazo (ver gráfica 2) en la gráfica se puede apreciar que la respuesta inmune no sobrepasó los 15 días, formando una curva típica de la inducción de la respuesta inmune ante el estímulo de una vacuna (Gordon 2001). La proliferación de células T CD4⁺ en el número y su porcentaje muestra ligeras variaciones con el testigo, lo que hace suponer que la proliferación de este tipo de células ocurrió fuera de este órgano, probablemente en los nódulos linfáticos regionales. Se puede observar un comportamiento característico de respuesta ante una vacuna, la disminución con respecto al día uno y el inicio de una curva ascendente para el número de linfocitos T CD4⁺, respuesta que se estabiliza a partir del día 15 formando una meseta en el día 30. Este sería el momento ideal para inocular una dosis de refuerzo. En un trabajo paralelo y que mide la inmunidad humoral, se detectó un nivel máximo de anticuerpos el día 15 para el grupo de vacuna comercial (Datos no publicados Loza-Rubio *et al*).

Las gráficas 5 y 6 no muestran la proliferación de T CD8⁺, probablemente por que éstas se han dirigido al sitio de replicación del virus con la finalidad de destruir las células donde se replicó inicialmente el virus, éste tipo de vacunas de acuerdo a la literatura, favorece una buena producción de T CD8⁺ (Zinkemagel 2002).

El plásmido pCI-neogpVR, no desarrolla esplenomegalia, el índice esplénico durante el desarrollo del trabajo se mantuvo con ligeras variaciones por abajo del testigo (ver gráfica 1). Una respuesta a la disminución significativa del número total de células en bazo, en el día 1 (ver gráfica 2) podría ser que este plásmido atrae a neutrofilos, a células dendríticas maduras e inmaduras y a algunos eosinofilos hasta el sitio de inoculación (Haddad *et al* 2000, Johansson *et al* 2002). En el primer día las células T CD4⁺ y T CD8⁺ se preparan para su expansión clonal, incrementan su tamaño pero no su número, (Kaech *et al*

2002) la literatura reporta que las vacunas génicas favorecen la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (Ivory and Chade 2004), por lo general esto ocurre después de una o más dosis, en el presente trabajo, el porcentaje de células T CD 4⁺ (gráfica 3) no muestra diferencias significativas las proporciones observadas sugieren que, otras células como es los linfocitos B, se encuentren proliferando, o bien T CD 4⁺ se encuentran fuera del bazo (Kusakabe *et al* 2000). En las vacunas antirrábicas de tipo recombinante, el protocolo más efectivo para inducir interferón INF γ y la activación de las células T citotóxicas es la revacunación (Lodmell and Ewalt 1999). Sin que existan diferencias significativas con el testigo, el día 15 es la máxima proliferación de T CD 4⁺, en las vacunas de ADN desnudo ocurre algo similar (Lodmell and Ewalt 2000) o el uso de la denominada pistola génica (Lodmell *et al* 1998), así como el empleo de adyuvantes génicos (Hunter 2002). Cuando se compara la proliferación de linfocitos T humanos al estímulo de una vacuna de rabia de células diploides, la respuesta óptima ocurre después de los ocho días (Ghaffari *et al* 2001) mientras que en este estudio con vacunas de ADN desnudo es de T CD 4⁺ al día 15 (ver gráfica 4). Al día 30 las células efectoras producto de la proliferación, al parecer han entrado en apoptosis, quedando en bazo las células de memoria, o bien se encuentran en los ganglios periféricos (Kaech *et al* 2002).

Aparentemente este plásmido no favoreció la proliferación de linfocitos T CD 8⁺ no se observaron diferencias significativas en el porcentaje y en los números absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de los animales objeto del presente estudio. Numerosos estudios han demostrado que las vacunas de ADN favorecen la respuesta de tipo Th-1 (Babiuk *et al* 2000) y que para un mejor balance entre Th-1/ Th-2 influye el tipo de vacuna de ADN, y la administración de plásmidos que codifican diferentes citocinas o moléculas co-estimuladoras (Kusakabe *et al* 2000). Por otro lado se debe tener en cuenta que para la proliferación de T CD8⁺, intervienen las moléculas clase I del CPH y que los miocitos expresan bajos niveles de este tipo de moléculas (Whitton *et al* 1999). Varios trabajos, sugieren que las células musculares no expresan sobre su superficie algunas moléculas como CD80 y CD86 que son críticas para la presentación de péptidos a las células T (Gurunathan *et al* 2000). Para que los antígenos sean procesados y presentados junto con las moléculas clase I del

49. 17 % respectivamente (valores normales de T CD4⁺ 30 40% Abbas *et al* 2004) tales porcentajes sugieren una respuesta balanceada entre células B y células T CD4⁺, algunos autores reportan que los adyuvantes génicos como el usado en este estudio, inducen la proliferación de células B (Krieg *et al* 1998) o bien que la proliferación ocurrió en el ganglio regional. En los números absolutos (ver gráfica 4) se aprecia con mayor claridad la curva ascendente de células T CD4⁺ y su caída en el día 30 como ocurre con la producción de anticuerpos.

La literatura señala que las vacunas génicas, por lo general estimulan al sistema inmune para que la respuesta incluya abundantes células T CD8⁺ (Zinkernagel 2002), en el presente trabajo no se observó tal desarrollo, diversos autores señalan que la proliferación de T CD8⁺ requiere usar revacunaciones (Lodmell *et al* 2002) para inducir tal respuesta y otros adyuvantes (Silk *et al* 2004), debido a que los miocitos expresan bajos niveles de moléculas clase I de CPH. (Whitton *et al* 1999) esto se corrobora durante la prueba de desafío, en ninguno de los animales vacunados y afectados de rabia mostraron rabia abortiva.

En la prueba de desafío, la vacuna comercial mostró una mayor protección, sin embargo con la dosis utilizada, ocurrieron tres muertes de diez ratones vacunados y cuando se redujo la dosis, la protección conferida no alcanzo los parámetros que muestran las vacunas de ADN desnudo. Este es uno de los mayores inconvenientes de las vacunas de virus vivo.

Un factor muy importante que muestran las vacunas génicas sobre las de la primera y segunda generación, es la inocuidad, del agente infeccioso solo se inocula un gen, (DNA o RNA) él cual codifica una sola proteína, la cual es la más importante para iniciar el proceso inmune. Como la proteína es producida intracelularmente tanto el CPH-I como el CPH-II son estimulados simultáneamente, lo que favorecería generar una respuesta similar a la que se presentaría en una infección natural, generando una respuesta inmune más balanceada, con mayor duración, y si se encuentra la vía de administración adecuada sería capaz también de inducir una respuesta en las mucosas (Beard & Mason 1998, Babiuk *et al* 2000).

Los animales inoculados con el plásmido pCI-neogpVR mostraron 77 % de protección al desafío, es necesario mencionar que en el presente estudio no se

CPH, estos deben entrar a las células vía picnocitosis, lo cual es muy ineficiente y requiere altas concentraciones de antígeno (Schuurhuis *et al* 2002). Una pistola génica permitiría que el antígeno llegue directamente al interior de las células de Langerhans. Esto favorecería que la respuesta de células T CD8⁺ en el bazo de ratones sea superior a la que se genera cuando el plásmido es inoculado con una jeringa, la cual no asegura que el antígeno penetre a los miocitos (Trimble *et al* 2003). Durante la prueba de desafío, ninguno de los animales vacunados y afectados de rabia mostraron signos de rabia abortiva, la cual es favorecida por los linfocitos T CD8⁺ (Sugamata *et al* 1992).

El plásmido, utilizado en el presente trabajo, adicionado con el adyuvante génico previamente descrito no induce esplenomegalia, (ver gráfica 1). La disminución significativa del índice esplénico que se observa en el día 1 posvacunación, probablemente sea debida a la gran variedad de células que son activadas por el adyuvante y la gran diversidad de respuestas inducidas por éste (Mutwiri *et al* 2003). En la gráfica 1 se puede observar el aumento progresivo del índice esplénico hasta llegar al día 7 en que se estabiliza, para declinar significativamente al día 30. La disminución de células totales que se observo en el día 1 (gráfica 2) obedece a la atracción que el plásmido y el adyuvante ejercen sobre las células de la inmunidad innata al sitio de inoculación y ganglio regional (Haddad *et al* 2000, Johansson *et al* 2002); esto se podría interpretar como una clara respuesta a la vacunación. Las células saldrían del bazo dirigiéndose al sitio de vacunación y ganglios regionales (Johansson *et al* 2002). La literatura, reporta la inducción de la proliferación de esplenocitos y maduración de células dendríticas por acción de los CpG's, (Medzhitov 2001) en el presente trabajo, se observo que en los días siguientes a la vacunación aumentó el número de células totales en el bazo de los ratones inoculados con CpG's, (ver gráfica 2). La mayor proliferación de células T CD4⁺ observada el día 4, (ver gráfica 3) es el resultado de la estimulación de los llamados " Toll-Like receptor" por parte del adyuvante, al modular estos la respuesta inmune (Spies *et al* 2003, Gelman *et al* 2004). La proliferación se mantiene constante hasta el día 15, donde se puede apreciar mayor proliferación de células T CD4⁺ los porcentajes son muy similares durante los días uno, cuatro siete y 15 del desarrollo de la prueba 48.7%, 48.5%, 42.5% y

revacunó, la cual ha sido sugerido por varios autores (Lodmell *et al* 2000, Perrin *et al* 2000). Usando revacunación se han reportado porcentajes muy similares 83.3 % (Fodor *et al* 2000). Una práctica común para probar la efectividad de una vacuna de este tipo, es el acondicionamiento previo del músculo con cardiotoxina (Bahloul 1998), dicha técnica no fue considerada dado el severo daño que se causa al músculo la aplicación de la toxina. La inoculación del plásmido con pistola génica (Lodmell *et al* 1998, Lodmell *et al* 2003) muestra buenos resultados, sin embargo en Medicina Veterinaria se considera impracticable (Shkreta *et al* 2003).

El plásmido pCI-neogpVR+CpG's mostró una protección al desafío del 77%, la diferencia mostrada fue en el tiempo en que se iniciaron los signos de la enfermedad; mientras que para pCI-neogpVR el primer animal que murió fue el día 9 posinoculación y el último el día 15, para pCI-neogpVR + CpG's fue el día 12 y el último el día 22.

El tiempo de mortalidad al desafío para el grupo vacunado con el plásmido, fue de 12 días ± 3 en tanto que para el grupo al que se adiciono CpG's fue de 17 días ± 5 días. Esto sugiere un principio de protección que no alcanza a desarrollarse y el ratón murió. Podemos suponer que en un animal que no sea tan susceptible a la rabia como son los ratones, los niveles de protección alcanzados serían suficientes. Una mejor protección se lograría revacunando, se ha demostrado que cuando el adyuvante y el plásmido son inoculados con jeringa existen variaciones si se compara contra una pistola génica (Trimble *et al* 2003). Se obtienen mejores resultados cuando el adyuvante se inocula días antes para que acondicione el músculo (Lodmell *et al* 2000), o bien usar una secuencia de bases diferente en el adyuvante CpG's. Krieg (2002) menciona que para cada especie animal, corresponde una secuencia de bases del ODN CpG, para el ratón es GACGTT, y un solo cambio en la secuencia de bases produce modificaciones en la actividad del adyuvante (Ae-Kyung *et al* 1998).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La vacunación con el plásmido pCI-neogpVR y con el virus vivo modificado no produce esplenomegalia en los días en que se evaluaron. Se sugiere complementar este trabajo con un estudio histopatológico, para confirmar si se formaron centros germinales en el bazo.

La máxima proliferación de células T CD4⁺ ocurrió con los ratones inoculados con pCI-neogpVR+CpG's durante el día 15 post-inoculación, aparentemente ocurrió en los ganglios regionales cerca del sitio de inoculación, o bien está fue muy sutil para que fuera detectada mediante este tipo de prueba, por lo que se deberán buscar otros marcadores de activación como son CD 24 y CD69.

El estudio de la respuesta inmune celular con este tipo de vacunas, debe continuar trabajándose, en especial la manera de aumentar la respuesta de T CD4⁺ para lo cual se sugiere el empleo de otro tipo de adyuvantes, ya sea de origen génico o tradicionales.

Debido a que la protección conferida por la vacuna génica no fue del 100% se sugiere realizar estudios complementarios que corroboren si con una revacunación se incrementa la protección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. REFERENCIAS

- Abbas A K Lichtman H A *Inmunología celular y molecular* Capitulo 2 p 31 (2003).
- Ae-Kyung Y, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG Oligodeoxyribonucleotides Rescue Mature Splen B Cells from Spontaneous Apoptosis and promote Cell Cycle Entry. *The Journal of Immunology* 169: 5898-5906.
- Aguilar S A., Tesoro C E., Hernández G R., Alonso M R. Desarrollo de una Vacuna Antirrábica de ADN Desnudo de Aplicación Intranasal. *Memorias INFAVET CONACYT tutor Alfredo Telles-Giron Rode Vol 10 pp 10-11 2005.*
- Anderson LJ, Winkler WG, Hafkin B, Keenlyside RA, D'Angelo LJ, Deitch MW. Clinical experience with a human diploid cell rabies vaccine. *JAMA.* 22-29 244(8):781-4. 1980
- Andreews A H., Blowey RW., Boyd H. ,Eddy R G., *Bovine Medicine Diseases and Husbandy of Cattle. Second Edition Blackwell Science 2004*
- Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg Infect Dis.* 9(3):333-7 2003.
- Aranda M, López-de Buen L. Rabies in Skunks from Mexico. *Journal of Wildlife Diseases* 35(3) p 574-577 1999.
- Artois M, Cliquet F, Barrat J, Schumacher CL. Effectiveness of SAG1 oral vaccine for the long-term protection of red foxes (*Vulpes vulpes*) against rabies. *Vet Rec.* 18;140(3):57-9 1997.
- Aucouturier J. Dupuis L Ganne V Adyuvantes designed for veterinary and human vaccines *Vaccine* 19 2001 2666- 2672
- Babiuk L.A. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine* 17(13-14):1587-95. 1999.
- Babiuk L.A., Babiuk S.L., Loehr B.I., van Drunnen S., van den Hurk L. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Veterinary Immunopathology* Vol 76 1-23 2000.
- Babiuk L.A., van Drunnen S., van den Hurk L., Babiuk S.L. Immunization of animals: from DNA to the dinner plate. *Veterinary Immunopathology* Vol 72 189-202 1999.

Bahri F, Letaief A, Ernez M, Elouni J, Chekir T, Ben Ammou S, Jemni L. Neurological complications in adults following rabies vaccine prepared from animal brains. *Presse Med.* 25(10):491-3 1996.

Bahloul Ch, Jacob Y, Tordo n, Perrin P, DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine*, 1998;16(4):417-425.

Bahloul L, Lafon M. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie.* 85(8):777-88 2003.

Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Virologica*. 75(7):3268-76.2001.

Barloug JE. *Manual de las Enfermedades Infecciosas de los Pequeños Animales* Editorial Médica Panamericana S.A. 1992

Barne M., Tsiang H. L'évolution des vaccins antirabiques humains de Pasteur á nos jours. *Bull Acad. Natle Méd* 179 No 5 1023-1032 1995

Barne M.

Bazin H. A brief history of prevention of infectious diseases by immunizations. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* Vol. 26 293-308 2003.

Beard W.C., Mason W. P. Out on the farm with DNA vaccines. *Nature Biotechnology* Vol. 16 1998.

- Benjamín E., Coico R.,Sunshine G *Immunology a Short Course* Cap 2 p 30 Fourth Edition Ed Wiley-Liss 2000.

Bellinger DA, Chang J, Bunn TO, Pick JR, Murphy M, Rahija R. Rabies induced in a cat by high-egg-passage Flury strain vaccine. *J Am Vet Med Assoc.* 183(9):997-8, 965 1983.

Berzofsky A.J. Ahlers D.J., Belyakov M.I. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nature Reviews* Vol 1 2001.

Bonito RF, de Oliveira NM, Nishioka Sde A. Adverse reactions associated with a Fuenzalida-Palacios rabies vaccine: a quasi-experimental study. *Rev Soc Bras Med Trop.* ;37(1):7-92004

Botvinkin AD, Poleschuk EM, Kuzmin IV, Borisova TI, Gazaryan SV, Yager P, Rupprecht CE. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg Infect Dis.* 9(12):1623-5 2003.

Boyle S. J., Silva A, Brady J.L., Lew A. M. DNA immunization: Induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94 pp 14626-14631 1997.

Bruyere V, Vuillaume P, Cliquet F, Aubert M. Oral rabies vaccination of foxes with one or two delayed distributions of SAG2 baits during the spring. Vet Res. 31(3):339-45 2000.

Cabasso VJ, Dobkin MB, Roby RE, Hammar AH. Antibody response to a human diploid cell rabies vaccine. Appl Microbiol. 27(3):553-61 1974.

Carroll EE, Dubielzig RR, Schultz RD. Cats differ from mink and ferrets in their response to commercial vaccines: a histologic comparison of early vaccine reactions. Vet Pathol.39(2):216-27 2002

CDC <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/> 2003

Chahroudi A, Silvestri G, Feinberg MB. Measuring T cell-mediated cytotoxicity using fluorogenic caspase substrates. Methods.31 (2):111-2.2003

Celis E, Ou D, Dietzschold B, Koprowski H. Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. J Virol.62 (9):3128-34 1988.

- Cliquet F, Aubert M. Elimination of terrestrial rabies in Western European countries. Dev Biol (Basel).119:185-204 2004.

Cliquet F, Picard-Meyer E. Rabies and rabies-related viruses: a modern perspective on an ancient disease. Rev Sci Tech. 23(2):625-42 2004.

Constantine D G Geographic Translocation of Bats: Know and Potencial Problems. Emerging Infectious Diseases Vol. 9 N0.1 2003

Corr M., Lee D., Carson A.D., Tighe H. Gene Vaccination whit Naked Plasmid DNA : mechanism of CTL Priming. J. E

-Cox J .H., Dietzschold B., Schneider L. G. Rabies Virus Glicoprotein II. Biological and Serological Characterization Infection and Immunity p 754-759 1977.

Chahroudi A. Silvestri G Feinberg MB Measuring T cell-mediated cytotoxic using fluorogenic caspase substrates. Methods (2):111-2 2003

Chattergoon M., Boyer J., Weiner E. D. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *The FASEB journal* Vol. 11 1997.

Damas R.C., Costa C.B., Vieira M. A., Bruña-Romero O. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *International Microbiology* 7: 83-94 2004.

Delpietro HA, Larghi OP, Russo RG. Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. *Prev Vet Med.* 16; 48(3):223-8. 2001 David D, Yakobson B, Smith JS, Stram Y.

David D, Yakobson B, Smith JS, Stram Y. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle- and Near-Eastern countries. *J Clin Microbiol.*38 (2):755-62 2000.

Dennehy PH. Active immunization in the United States: developments over the past decade. *Clin Microbiol Rev.* 14(4):872-908 2001

Doe B. Selby M., Barnett .S, Baenziger J., Walker C. M. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996

-Dreesen W. D. A global review of rabies vaccines for human use. *Vaccine* Vol. 15 S2-S5 1997.

-Dunhan S.P The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine *Research in Veterinary Science* 73 9-16 2002.

Eisinger D, Thulke HH, Selhorst T, Muller T. Emergency vaccination of rabies under limited resources -- combating or containing? *BMC Infectious Diseases*, 5:10 doi:10. 1186/1471-2334-5-10 2005.

Ellis W.R. New technologies for making vaccines. *Vaccine* 17 1596-1604 1999.

Faber M, Pulmanusahakul R, Nagao K, Prośniak M, Rice AB, Koprowski H, Schnell MJ, Dietzschold B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101 (46):16328-32. 2004

-Field, H., McCall, B. & Barrett, J. Australian bat Lyssavirus infection in a captive juvenile black flying fox. *Emerg. Infect Dis* 5,438-40 1999.

-Flores CR. Técnicas, sustancias y Estrategias para el control de murciélagos vampiros. *Boletín de la OPS.* 2003.

-Follmann EH, Ritter DG, Baer GM. Evaluation of the safety of two attenuated oral rabies vaccines, SAG1 and SAG2, in six Arctic mammals. *Vaccine* 14(4):270-3 1996.

Fooks AR, Brookes SM, Johnson N, McElhinney LM, Hutson AM. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. *Epidemiol Infect.* 131(3):1029-39 2003.

Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AF. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun.* (8):4839-45 2001.

Frolich K, Thiede S, Kozikowski T Jakob W. A Review of mutual Transmission of Important Infectious Diseases between Livestock and Wildlife in Europe. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Oct; 969:4-13 2002

- Fodor I. Kucsera L. Fodor N. Pálfi V. Grabko V. I. Gene Immunization of Mice whit Plasmid DNA Expressig Rabies Virus Glycoprotein *Acta Veterinaria Hungarica* 48 (2) pp229 236 2000.

- Fu Z. F. Rabies and rabies research: past, present and future *Vaccine* Vol 15 Suppl 1997.

Gamoh K, Shimazaki Y, Senda M, Makie H, Itoh O, Muramatsu M, Hirayama N, Hatakeyama H. Establishment of a potency test by ELISA for a rabies vaccine for animal use in Japan *J Vet Med Sci.* 65(6):685-8 2003.

Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol.* 172(10):6065-73 2004.

Gaudini Y Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J Cell Biol.*; 50(3):601-12 2000.

Gluck R, Wegmann A, Germanier R, Keller H, Hess MW, Kraus-Ruppert R, Wandeler AI. A new, highly immunogenic duck embryo rabies vaccine. *Lancet.* 14;1(8381):844-5 1984.

-Gordon A. Vaccines and Vaccination *The New England Journal of Medicine.* Vol 345, No.14 2001.

Grndien E. Evaluation of Tests for Rabies Antibody and Analysis of Serum Responses After Administration of Three Different Types of Rabies Vaccines. *J Clin Microbiol.* 5(3):263-7 1977.

Gurunathan S. Klinman D.M., Seder A. R. DNA Vaccines: Immunology, Application, and Optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 927-974 2000.

Haddad D, Ramprakash J, Sedegah M, Charoenvit Y, Baumgartner R, Kumar S, Hoffnan SL, Weiss WR. Plasmid vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles. *J Immunol.* 165(7):3772-81 2000.

Hanlon CA, Niezgoda M, Morrill P, Rupprecht CE. Oral efficacy of an attenuated rabies virus vaccine in skunks and raccoons. *J Wildl Dis.* 38(2):420-7 2002.

Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol.* 1(2):101-9 2002.

- Hilleman M. R. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries *Vaccine* 18 1436-1477 2000.

Hooper D.C. The role of immune responses in the pathogenesis of rabies. *J Neurovirol* 11(1):88-92 2005

Hunter L.R. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 20 S7-S12 2002.

Jackson A.C., Wunner H.W. Rabies Academia Press 2000.

- Jacob T. J. An ethical dilemma in rabies immunisation. *Vaccine* Vol. 15 S12-S15 1997.

Janeway A. Travers P. Walport M. Shlomchik M. *Inmunobiología El Sistema Inmunitario en Condiciones de Salud y Enfermedad* Editorial Masson 2003

John TJ. An ethical dilemma in rabies immunisation. *Vaccine*.15 Suppl: S12-5. 1997

Johansson E, Wallgren P, Fuxler L, Domeika K, Lefevre F, Fossum C. The DNA vaccine vector pcDNA3 induces IFN-alpha production in pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 87(1-2):29-40 2002.

Johnson N, Mansfield KL, Fooks AR. Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol.*83 (Pt 11):2663-9 2002. *J Virol.* (21):11471-9. 2003

Jørgensen JB, Johansen LH, Steiro K, Johansen A. CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).

Kaech SM, Wherry E J, Ahmed R Effector and Memory T-cell Differentiation: Implications for vaccine Development. *Nature Reviews* Vol. 2 251-262 2002.

-Kampen van K.R Recombinant vaccine technology in veterinary medicine. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice Vol 31 No. 3 2001.

Kalina T, Vaskova M, Mejstrikova E, Madzo J, Trka J, Stary J, Hrusak O. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. BMC Cancer. 12; 5(1):38 2005.

Kassis R, Larrous F, Estaquier J, Bourhy H. Lyssavirus matrix protein induces apoptosis by a TRAIL-dependent mechanism involving caspase-8 activation. Virol.78 (12):6543-55 2004.

Kitala PM, Lindqvist KJ, Koimett E, Johnson BK, Chunge CN, Perrin P, Olsvik O. Comparison of human immune responses to purified Vero cell and human diploid cell rabies vaccines by using two different antibody titration methods. J Clin Microbiol. 28(8):1847-50 1990.

Kongkaew W, Coleman P, Pfeiffer DU, Antarasena C, Thiptara A. Vaccination coverage and epidemiological parameters of the owned-dog population in Thungsong District, Thailand. Prev Vet Med. 30;65(1-2):105-15.2004

Koser ML, McGettigan JP, Tan GS, Smith ME, Koprowski H, Dietzschold B, Schnell MJ. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(25):9405-10 2004.

Krebs W. j Williams M S., Smith S.J, Ruppecht Ch. E Childs E J. Rabies among infrequently Reported Carnivores in The united States 1960-2000. Journal of Wildlife Diseases, 39(2) pp 253-261 2003.

Krieg A M. CpG Motif in Bacterial DNA and Their Immune Effects. Annu. Rev. Immunol. 20: 709-760 2002.

Lafon M. Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. Curr Top Microbiol Immunol. 289:239-58 2005.

Langevin C, Jaaro H, Bressanelli S, Fainzilber M, Tuffereau C. Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. J Biol Chem; 277(40):37655-62 2002.

Laothamatas J, Hemachudha T, Mitrabhakdi E, Wannakrairot P, Tulayadaechanon S. MR imaging in human rabies. AJNR Am J Neuroradiol. 24(6):1102-9 2003.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Lavander J. F. & Van Frank R. M. Zonal-Centrifuged Purified Duck Embryo Cell Culture Rabies Vaccine for Human Vaccination *Applied Microbiology*, Vol.22 No 3 p 358-365 1971.

Liu A.M. The immunologist's grail: Vaccines that generate cellular immunity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol 94 pp 10496- 10498 1997.

- Lodmell D.L. Ray N.B DNA immunizations protects nonhuman primates against rabies virus *Nature Medicine* Vol. 4 No8 1998.

- Lodmell D.L. Ray N.B, Ewalt L.C. Gen gun particle-mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection. *Vaccine* Vol 16 No.2/3 1998.

Lodmell D.L. Ray N.B, Ulrich J.T. Ewalt L.C. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipi A(MPL) *Vaccine* Vol 18 1059-1066 2000.

- Lodmell D.L., Ewalt L.C. Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA inactivated virus, or recombinant vaccine virus vaccines. *Vaccine*. 8;18(22):2394-8 2000.

Lodmell D.L., Ewalt L.C. Post-exposure DNA vaccination protects mice against rabies virus. *Vaccine* 21; 19 (17-19):2468-73 2001.

Loza-Rubio. E, Gómez L M A De Pasteur a Nuestros Días Batalla contra la rabia *Ciencia y Desarrollo* 27 2004.

- Loza- Rubio. E, Aguilar S. A. Estudio de la variabilidad molecular del virus de la rabia en México. *Ciencia Veterinaria* Vol.8 pp 51-84 1998.

-Loza- Rubio. E, Aguilar S. A., Tordo N. Evidencias de una nueva variante del virus de rabia en México, que circula en zorrillos Folleto de Investigación No.1 INIFAP1998.

Loza- Rubio. E Rojas E. Banda V. M Nadin-Davis S.A. Cortez B. Detection of multiple strains of rabies virus RNA using primers designed to target Mexican vampire bat variants. *Epidemiol. Infect* 1-8 2005

MacInnes CD, Smith SM, Tinline RR, Ayers NR, Bachmann P, Ball DG, Calder LA, Crosgrey SJ, Fielding C, Hauschildt P, Honig JM, Johnston DH, Lawson KF, Nunan CP, Pedde MA, Pond B, Stewart RB, Voigt DR. Elimination of rabies from red foxes in eastern Ontario. *J Wildl Dis.* 37(1):119-32 2001.

Maloy J. K., Erdmann I. Basch V., Sierro S., Kramps A. T., Zinkernagel M.R., Oehen S., Künding T. Intralymphatic immunization enhances DNA vaccination Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol 98 No 6 3299-3303 2001.

–Mackay I.R., Rosen F. S. Advances in Immunology. The New England Journal of Medicine Vol 345, No 14 2001.

Madhusudana SN, Paul JP, Abhilash VK, Suja MS. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. Int J Infect Dis. 8(6):339-45 2004.

Mebatsion T., Schnell J. M., Cox H.J., Finke S., Conzelmann K-K. Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. Proc. Natl Acad. Sci. USA Vol. 93 pp 7310-7314.

Medzhitov R. CpG DNA: Security code for host defense. Nature Immunology Vol2 No 1 15-16 2001

Meltzer MI, Rupprecht CE. A review of the economics of the prevention and control of rabies. Part 2: Rabies in dogs, livestock and wildlife. Pharmacoeconomics. 14(5):481-98 1998.

Meyer E.K Vaccine-associated adverse events. Vet Clin North Am Small Anim Pract. (3):493-514, vi.2004.

Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.93 pp 1134-48 1996.

Murphy F A., Gibas A P. , Horzinek MC. , Studdert M J. Veterinary Virology Third Edition Academic Press 1999.

Mutwiri G., Pontarollo R., Babiuk S., Griebel P., van Drunen S., MENA A., Potter A., Babiuk L. A. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals Veterinary Immunology and Immunopathology Vol .91 (2) 89-103 2003.

Nadin-Davis SA, Sheen M, Wandeler AI. Use of discriminatory probes for strain typing of formalin-fixed, rabies virus-infected tissues by in situ hybridization. J Clin Microbiol. 41(9):4343-52. 2003

Nakahara T., Toriumi H., Irie Takashi, Takahashi T., Ameyama S. Mizukoshi M., Hawaii A. Characterization of a Low-Migrating Component of the Rabies Virus Matrix Protein Strongly Associated with the Viral Glycoprotein Microbiol. Immunol 47(12) 977-988 2003.

National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. (NASPHV). Compendium of animal rabies prevention and control, 2005. MMWR Recomm Rep. Mar 18;54(RR-3):1-8.2005

Nelson KE, Vithayasai V, MakornKawKayoon S, Batt MD, Panas-Amporn K, Anderson JT. Purified duck embryo rabies vaccine. An accelerated schedule for preexposure immunization against rabies. JAMA. 18;238(3):218-20 1977.

Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Kluter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. J Immunol Methods. 1;275(1-2):57-68 2003.

Nishizono A, Mannen K, Elio-Villa LP, Tanaka S, Li KS, Mifune K, Arca BF, Cabanban A, Martinez B, Rodriguez A, Atienza VC, Camba R, Resontoc N. Genetic analysis of rabies virus isolates in the Philippines. Microbiol Immunol. 46(6):413-7 2002.

Ohmori K, Masuda K, Sakaguchi M, Kaburagi Y, Ohno K, Tsujimoto H. A retrospective study on adverse reactions to canine vaccines in Japan. J Vet Med Sci. 64(9):851-3 2002.

Organización Mundial de Sanidad Animal OIC (World Organisation for Animal Health) Normas Sanitarias 2003

- Organización Panamericana de la Salud Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas, Vol. XXIII, 2000.

Organización Panamericana de la Salud Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas, Vol. XXIII, 2001.

Organización Panamericana de la Salud Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas, Vol. XXIII, 2002.

-Osorio J. E. Tomlinson C. C., Frank.R.S. , Haanes E.J., Haynes J. R. Stinechcomb D.T. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus Vaccine 17 1109-1116 1999.

Palese P, Zheng H , Othmar G , Pleschka S Garcíá-Sastre A. Negative-strand RNA viruses: Genetic engineering and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 93 pp 11354-8 1996.

Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(21):11349-53 1996.

- Paolazzi C.C. Pérez O. De Filippo J. Rabies Vaccine Developments Employing Molecular Biology Methods. *Molecular Biotechnology* Vol 11 137-147 1999.

Pastoret PP, Vanderplasschen A. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 26(5-6): 343-55 2003.

Pattanapanyasat K, Thakar MR. CD4+ T cell count as a tool to monitor HIV progression & anti-retroviral therapy. *Indian J Med Res.* 21(4):539-49 2005.

Pearce JMS Historical Note *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:82 2002.

Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Setien A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmezieres E, Aubert M, Cliquet F, Tordo N. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine.* 18(5-6):479-86 2000.

Pinto AR, Fitzgerald JC, Giles-Davis W, Gao GP, Wilson JM, Ertl HC. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *J Immunol.* 171(12):6774-9 2003.

Perry LL, Lodmell DL. Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine resistance to street rabies virus. *J Virol.* 65(7):3429-34 1991.

Piyasirisilp S, Hemachudha T. Neurological adverse events associated with vaccination. *Curr Opin Neurol.* (3):333-8 2002.

Prehaud C, Lay S, Dietzschold B, Lafon M. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. *J Virol.* 77(19):10537-47 2003.

Perrin P., Jacob Y., Aguilar-Sétien A., Loza-Rubio E., Jallet C., Desmézières E., Aubert M., Cliquet F., Tordo N. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus *Vaccine* Vol8 479-486 1998.

Poranen M.M., Daugelavicius R., Bamford D.H. Common Principles in Viral Entry. *Annu. Rev. Microbiol* 56:521-38 2002.

Promega Corporation, Madison, WI. EUA., catalogo No E1481 pp

Public Health Agency of Canada (PHAC) International Notes- Update: Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients. *CCDR* Vol 30-21 2004

Randall DA, Williams SD, Kuzmin IV, Rupprecht CE, Tallents LA, Tefera Z, Argaw K, Shiferaw F, Knobel DL, Sillero-Zubiri C, Laurenson MK. Rabies in endangered Ethiopian wolves. *Emerg Infect Dis.* 10(12):2214-7 2004.

Regueiro G. JR López L C Gonzalez R S Martínez N E *Inmunología Biología y patología del sistema inmune* Editorial Médica Panamericana 2002.

Rempel JD, Quina LA, Blakely-Gonzales PK, Buchmeier MJ, Gruol DL. Viral induction of central nervous system innate immune responses. *J Virol.* 79(7):4369-81 2005.

Rodriguez M.M., Ribeirão M.,Pereira-Chioccola V., Renia L., Costa F. Predominance of CD4 and CD8 Tc1 Cells Revealed by Characterization of the Cellular Immune Response Generated by Immunization whit a DNA Vaccine Containing a *Trypanosoma cruzi* Gene. *Infection And Immunity* p 3855-3863 1999.

Rodney E R, Mayes C B., Smith J S, Neill U S. Bat Rabies , Texas 1996- 2000 *Emerging Infectious Diseases* Vol. 10 N0 5 2004.

Rojas-Espinosa E. *Inmunología (de memoria)* Editorial Médica Panamericana 2001

Russell CA, Smith DL, Childs JE, Real LA. Predictive Spatial Dynamics and Strategic Planning for Raccoon Rabies Emergence in Ohio. *PLoS Biol* 3(3): e88 2005

Rupprecht Ch. E, C. A. Hanion, T. Hemachudha *Reviews Rabies re-examined The Lancet Infectious Diseases* Vol 2 June 2002.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Slate D. Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control. *Dev Biol (Basel).* 119:173-84 2004.

SAGARPA 2004 <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx>.

Sampath G., Suhasini V. Reddya, Lakshmi M Prasad RAO, Udayabhaskara Raob, C. Palaniappan C. An immunogenicity study of a newly introduced purified vero cell rabies vaccine (*Abhayrab*) manufactured in India *Vaccine* Vo 23 897-900 2005

Sakamoto.S., Ide T., Tokiyoshi S., NakaoJ., Hamada F., Yamamoto M., Grosby A. J., Ni Y., Hawai A. Studies on the structres and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. *Vaccine* Vol7 205-218 1999.

Sato G, Itou T, Shoji Y, Miura Y, Mikami T, Ito M, Kurane I, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *J Vet Med Sci.* 66(7):747-53. 2004.

Shankar V, Dietzschold B, Koprowski H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *J Virol.* 65(5):2736-8 1991.

Scheerlink J Y Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine.* 21;19(17-19):2647-56 2001.

Shkreta L, Talbot BG, Lacasse P. Optimization of DNA vaccination immune responses in dairy cows: effect of injection site and the targeting efficacy of antigen-bCTLA-4 complex. *Vaccine.* 2003 Jun 2;21(19-20):2372-82

Silk JD., Hermans IF, Gileadi U, Chong WT, Shepherd D, Salio M, Bini M., Schmidt RR, Lunt SJ, Williams KJ ,Stratford IJ , Adrian L. Harris, and Cerundolo V. Utilizing the adjuvant properties of CD1d-dependent NK T cells in T cell-mediated immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation* Vol 114 12 ,1800-1811 2004

Shin T, Weinstock D, Castro MD, Hamir AN, Wampler T, Walter M, Kim HY, Acland H. Immunohistochemical localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase within neurons of cattle with rabies. *J Vet Med Sci.* 66(5):539-41 2004.

Secretaría de Salud México 2001 Programa de Acción: Rabia

Secretaría de Salud México www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2004

Secretaría de Salud México www.dgepi.salud.gob.mx

Sehgal S, Bhattacharya D, Bhardwaj M. Clinical evaluation of purified vero-cell rabies vaccine in patients bitten by rabid animals in India. *J Commun Dis.* 26(3):139-46 1994.

Shankar V., Dietzchold B., Koprowski H Direct Entry of Rabies Virus into the Central Nervous System without Prior Local Replication *Journal of Virology* Vol.65No.5 p 2736-2738 1991.

Sheeler-Gordon LL, Smith JS. Survey of bat populations from Mexico and Paraguay for rabies. *J Wildl Dis.* 37(3):582-93 2001.

Shkreta L., Talbot B.G. Lacasse P. Optimization of DNA vaccination in dairy cows: effect of injection site and the targeting efficacy of antigen-Bctla-4 complex. *Vaccine* 21 2372-2382 2003.

Siddiqui A, Usmani RI, Anwer S, Afsar S. Guillain-Barre syndrome occurring after rabies vaccination. *Pak Med Assoc.* 55(2):87-8 2005.

Schijns E.J.C. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity *Current Opinión in Immunology* 2000.

Smith J. New Aspects of Rabies whit Empahasis on Epidemiology, Diagnosis, and Prevention of the Diseases in The United States. *Clinical Microbiology Reviews* pp 166-177 1996

Spies B, Hochrein H, Vabulas M, Huster K, Busch DH, Schmitz F, Heit A, Wagner H. Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J Immunol.* 1;171(11):5908-12 2003.

Srinivasan A, Burton CE., Kuehnert J M Transmission of Rabies Virus from a Donor to Four transplant Recipients. *The New England* Vol.352:1103-1111 2005.

Srivastava I.K., Liu M.A Gene Vaccines. *Ann. Intern. Med.* 138(7) 550-9 2003.

Stantic-Pavlinic M. Rabies treatment of healt care staff. *Swiss Med Wkly* 132: 129-131 2002

Storni T., Ruedl Ch., Renner W.A., Bachmann F. M. Innate Immunity Together with Duration of Antigen Persistence Regulate Effector T Cell Induction .*The Journal of Immunology* 795-801 2003

Schuurhuis DH, Ioan-Facsinay A, Nagelkerken B, van Schip JJ, Sedlik C, Melief CJ, Verbeek JS, Ossendorp F. Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo. *J Immunol.* 168(5):2240-6 2002.

Svahn A, Linde A, Thorstensson R, Karlen K, Andersson L, Gaines H. Development and evaluation of a flow-cytometric assay of specific cell-mediated immune response in activated whole blood for the detection of cell-mediated immunity against varicella-zoster virus. *J Immunol Methods.* 1; 277(1-2):17-25 2003.

Swamy HS, Anisya V, Nandi SS, Kaliaperumal VG. Neurological complications due to Semple-type antirabies vaccine. Clinical and therapeutic aspects. *J Assoc Physicians India.* 39(9):667-9 1991.

Takayama-Ito M, Ito N, Yamada K, Minamoto N, and Sugiyama M. Region at amino acids 164 to 303 of the rabies virus glycoprotein plays an important role in pathogenicity for adult mice. *Neurovirol.* 10(2):131-5 2004.

Trimble C, Lin CT, Hung CF, Pai S, Juang J, He L, Gillison M, Pardoll D, Wu L, Wu TC. Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. *Vaccine.* 21(25-26):4036-42 2003.

Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, Hacker H, Wagner H. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol.* 1;164(5):2372-8 2000.

- Vargas G. R. y Cardenas L. J. Epidemiología de la Rabia: Situación Actual en México. *Ciencia Veterinaria* 7 1996

Velasco-Villa A, Gomez-Sierra M, Hernandez-Rodriguez G, Juarez-Islas V, Melendez-Felix A, Vargas-Pino F, Velazquez-Monroy O, Flisser A. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *J Clin Microbiol.*; 40(3):951-8. 2002.

Wagner H. Toll Meets Bacterial CpG-DNA Immunity Vol. 14 499 502 2001.

Wang B, Norbury CC, Greenwood R, Bennink JR, Yewdell JW, Frelinger JA. Multiple paths for activation of naive CD8+ T cells: CD4-independent help. *J Immunol.* 1;167(3):1283-9 2001.

Warren B. Ballard, Erich H. Follmann, Donald G. Ritter, Martin D. Robards, and Matthew A. Cronin Rabies and Canine Distemper in an Arctic Fox Population in Alaska *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1),pp. 133-137 2001.

Weiland F. Cox J H, Meyer S Dahme E Reddhase M Rabies Virus Paralysis: Immunopathogenesis of Nonfatal Paralytic Rabies. *Journal of Virology* Vol. 66 No 8 5096-5099 1992

-Whitt A.M. Buonocore L., Prehaud Ch., Rose K.J. Membrane Fusion Activity, Oligomerization, and Assembly of Rabies Virus Glycoprotein *Virology* 185,681-688 1991.

- Whitton J L. Rodriguez F., Zhang J., Hazte D.E. DNA Immunization: mechanistic studies *Vaccine* 17 1612-1619 1999.

WHO Fact Sheet N°99 2001

WHO Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire 5 APRIL 2002, 77th YEAR / 5 AVRIL 2002, 77e ANNÉE No. 14, 77, 109–120 2002.

Wegmann A, Gluck R, Keller H, Matthieu JM. A highly efficient, highly purified duck embryo rabies vaccine. Schweiz Med Wochenschr. 7; 115(49):1779-81 1985.

- Woldehiwet Z. Rabies: recent developments Research in Veterinary Science 73(1):17-25 2002

Yiqiang Wang and Arthur M. Krieg. Synergy between CpG- or non-CpG DNA and specific antigen for B cell activation. International Immunology, Vol. 15, No. 2, pp. 223-231 2002.

Zinkernagel R.M. On Natural and Artificial Vaccinations. Annu. Rev. Immunol. 21 120601-141045