

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“EFECTO DE LA PROTEÍNA N DEL VIRUS DE RABIA
SOBRE LA RESPUESTA SEROLÓGICA EN
HAMSTERS, CONFERIDA CON UNA VACUNA
EXPERIMENTAL DE PI 3”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
CÉSAR JOSÉ GUZMÁN REYES

ASESOR: M. EN C. RAÚL ARTURO MAR CRUZ

CUAHUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2013



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.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	Pág. 1
II.	INTRODUCCIÓN.....	Pág. 2
1.	PARAINFLUENZA 3.....	Pág. 2
A.	ETIOLOGÍA.....	Pág. 2
B.	EPIDEMIOLOGÍA.....	Pág. 5
2.	RABIA.....	Pág. 6
A.	EPIZOTIOLOGÍA.....	Pág. 6
B.	ETIOLOGÍA.....	Pág. 8
C.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUPERANTÍGENOS.....	Pág. 10
III.	JUSTIFICACIÓN.....	Pág. 12
IV.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	Pág.13
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág. 14
VI.	RESULTADOS.....	Pág. 17
VII.	DISCUSIÓN	Pág. 30
VIII.	CONCLUSIÓN	Pág. 35
IX.	LITERATURA CITADA	Pág. 36

AGRADECIMIENTOS

Este logro se lo dedico a dios por darme la vida.

A mis padres y hermanos por inculcarme el sentido de la superación constante.

En especial a mi hermana Amanda que con su ayuda y ejemplo de constancia, contribuyó a esta meta.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio por todo el apoyo brindado para este proyecto.

Dedicada a mis hijos y esposa.

I.-RESUMEN

Se determinó el efecto de la proteína N del virus de la rabia, adicionada en diferentes dosis a una vacuna experimental de parainfluenza 3 bovina sobre la respuesta inmune humoral en hámsters. Para ello se formaron ocho grupos con cinco hámsters cada uno, cuya edad promedio fue de 28 días. La vacuna experimental de PI-3 tuvo un título de $10^{5.7}$ TCID 50%. Se le agregaron diferentes dosis de proteína N. Se tomaron muestras sanguíneas a los 0, 7, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días posvacunación (pv). Los sueros se titularon mediante la técnica de seroneutralización en placa. La respuesta humoral más alta la confirió la vacuna experimental de PI3 adicionada con 20 μ g de proteína N expresada por un sistema de Baculovirus recombinante, (N-Bac), (grupo 6). De igual manera el grupo que contuvo 20 μ g de proteína N obtenida de cultivo celular infectado, aplicada tres días antes de la vacunación mostró un título de anticuerpos considerable al resto de los grupos ($p < 0.05$). El aumentar la cantidad de proteína N no produjo un incremento de la respuesta humoral. Los animales se desafiaron con una cepa patógena de PI3, vía aérea a los 150 días posvacunación (PV). Al realizar el aislamiento del virus a los seis días posdesafío se observó que el virus no pudo reaislarse de los animales del grupo 6.

Se concluye que el tratamiento que indujo la mayor respuesta humoral, además de proteger a los animales por más de 4 meses fue cuando se adicionaron 20 μ g de proteína N del virus de la rabia, obtenida de un sistema recombinante.

II.-INTRODUCCIÓN

1.- PARAINFLUENZA 3

El virus de parainfluenza 3 afecta a los bovinos y ovinos. El virus se ha aislado del ganado bovino, búfalo, caballo, mono y hombre. Experimentalmente se ha logrado infectar a hámsters y cerdos. A las cepas humanas, bovinas y ovinas se les relaciona muy estrechamente (Howard y Francis, 1981). Sin embargo es sabido que las cepas del virus PI3 humana y bovina son serológicamente distintas (Mohanty y Dutta, 1981).

El virus de PI3 bovina interviene en lo que se conoce como el complejo respiratorio de los bovinos; en el cual hay uno o varios virus que llegan y sensibilizan a los epitelios respiratorios, esto hace que posteriormente puedan penetrar fácilmente otros microorganismos, tales como mycoplasmas y otras bacterias. El virus PI3 interviene en la neumonía viral de los terneros y la septicemia hemorrágica o fiebre de embarque, en la cual también intervienen bacterias del genero *Pasteurella sp.* entre otras (Riedemann et al, 1996; Larski 1989; Dinter, 1991).

Si bien la morbilidad producida por la enfermedad respiratoria se considera relativamente baja, las pérdidas económicas se consideran severas, por los costos de tratamiento y reducción de ganancia de peso, tanto en el ganado de leche como en el de carne.

Se ha demostrado en investigaciones serológicas que estas infecciones están ampliamente diseminadas a nivel mundial (Riedemann et al, 1996; Fenner, 1992).

A.- ETIOLOGIA:

El virus de PI3 pertenece al orden de los Mononegavirales, familia *Paramyxoviridae*, del género *Paramixovirus*. Los paramixovirus y los ortomixovirus fueron clasificados conjuntamente con el término mixovirus debido a la similitud morfológica de sus viriones y al hecho de que dos prototipos de ambos grupos, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus influenza, poseen una hemaglutinina y una neuraminidasa. Sin embargo más tarde se comprobó que los virus de cada grupo diferían en propiedades tan básicas como su estructura genómica y su modo de replicación, por lo que fueron separados en dos familias, *Paramyxoviridae* y la *Ortomyxoviridae* (Murphy et al 1999).

La familia *Paramyxoviridae* contiene tres géneros, *Paramixovirus*, *Morbilivirus* y *Pneumovirus*, e incluye algunos de los agentes patógenos más importantes del hombre y de los animales domésticos (Fenner, 1992 ; Murphy et al. 1999)

Los viriones de los virus que pertenecen a la familia *Paramyxoviridae* son pleomórficos, normalmente filamentosos o redondeados. El virus PI3 tiene un diámetro de 100 a 300 nm o más. Están formados por una envoltura lipídica doble con peplómeros glucoproteicos que rodean una nucleocápside con forma de espina de pescado de 12 ó 18 nm según el género (Murphy et al, 1999; Kazataka et al, 1998).

La cepa bovina del virus PI3 tiene una densidad de flotación de 1,197 g/cm³ en CsCl. Su genoma está formado por una sola molécula lineal de sentido negativo de RNA de cadena sencilla, de 15.4 a 20 kb. El virus posee seis polipéptidos estructurales, dos de los cuales son glucosilados (Murphy et al, 1999; Kazataka et al, 1998; Galiski et al, 1991; Bradford, 1990; Pinaki, 1989). Existen dos tipos de glucoproteínas de la envoltura con tres funciones; la primera está representada por una proteína F (fusión), mientras que las funciones de hemaglutinina y neuraminidasa están mediadas en los distintos virus por las proteínas HN (hemaglutinina, neuraminidasa), H o G (glucoproteina). La proteína HN se encarga de la fijación del virus a las células y de la liberación de las mismas, es la que

interviene en el primero y en el último paso de la infección, la hemoaglutinina se une a los receptores de superficie celular, los cuales pueden ser glicoproteínas que contienen ácido siálico o gangliósidos, mientras que la neuraminidasa, participa en la segmentación enzimática de los residuos de ácido siálico, para prevenir la autoagregación de las partículas virales durante la liberación de las células infectadas. La proteína F también colabora en la fijación del virus pero, además, se encarga de la fusión célula – célula y permite que la infección se difunda sin la salida del virus de las células e incluso en presencia de anticuerpos (Research S ; Dinter, 1991; Fenner, 1992 ; Murphy et al, 1999).

Para adquirir actividad biológica, la proteína F debe ser fraccionada por una proteasa celular en dos polipéptidos F1 y F2, unidos por puentes disulfuro, cuando esto no se produce, como sucede en algunos cultivos celulares, el virus formado no es infeccioso. Dado que la proteína F es esencial para la penetración del virus en la célula hospedadora mediante fusión de la envoltura vírica con la membrana plasmática, así como para la difusión intercelular directa mediante fusión celular, su papel es trascendental en la patogenia de las infecciones por paramyxovirus, incluyendo las infecciones persistentes (Research S.; Dinter, 1991; Fenner, 1992; Murphy et al, 1999).

El paramixovirus se fija a los receptores de la superficie de la célula con la hemaglutinina y penetra la célula por fusión con la membrana celular. Los Paramixovirus se replican en el citoplasma. Los viriones se adhieren a través de la proteína HN a la sialoglicoproteína celular o glicolípidos receptores. Posteriormente, la proteína F media la fusión de la cubierta viral con la membrana plasmática, dentro de un pH fisiológico. La nucleocápside liberada se mantiene intacta con sus tres proteínas asociadas (N, P y L), las cuales son requeridas para la transcripción mediante la RNA polimerasa RNA-dependiente (transcriptasa). El genoma se transcribe progresivamente en 6 a 10 mRNA mediante la síntesis secuencial a partir de un promotor. También se sintetiza la copia del

genoma completo que sirve como templete para la replicación del RNA genómico de sentido negativo (Fenner, 1992; Lamb y Kolakofsky 1996; Murphy et al, 1999).

El término Parainfluenza se dio porque algunos signos son similares a los de la enfermedad producida por el virus de la influenza, y porque la partícula viral tiene actividades de hemoaglutinina y neuraminidasa, similares a las del virus de influenza (Collins y Chanok, 1996). Las glicoproteínas de superficie les confieren al virión actividades biológicas ; tenemos como ejemplo, que la proteína HN media la adsorción de eritrocitos (hemoadsorción), la aglutinación de eritrocitos en suspensión (hemoaglutinación), y la partición del ácido siálico (a través de la neuraminidasa); mientras que la proteína F, media la lisis de los eritrocitos adsorbidos (Choppin y Scheid, 1980).

B.- EPIDEMIOLOGIA:

El virus PI3 fue aislado por primera vez en EU de la mucosa nasal de vacas mostrando signos clínicos de fiebre de embarque. En los siguientes años el virus de PI3 fue aislado en animales del continente europeo y subsecuentemente éste se ha distribuido en la población bovina a nivel mundial.

Las infecciones con el virus PI3 bovino se han observado con mayor frecuencia en los meses de otoño e invierno (Dinter, 1991).

El ganado es infectado cuando el virus se encuentra en el aire y penetra vía respiratoria, esto ocurre principalmente cuando los animales se encuentran estabulados.

El virus PI3 es muy estable en la secreción nasal, éste al entrar en las vías respiratorias ataca a la mucosa nasal.

El virus PI3 asociado con los factores de estrés, las bacterias y los mycoplasmas oportunistas hacen que se presenten los signos de la enfermedad. Los virus son secretados por la mucosa nasal en forma de aerosol y secreción ocular.

La severidad de los signos clínicos ha sido considerablemente variable. Algunas veces la infección es asintomática. En la mayoría de los casos la enfermedad se ha caracterizado por tos, fiebre, secreción nasal y en algunos casos ocular, también se observa depresión. (Bradford, 1990; Larski, 1989; Dinter, 1991; Ernst, 1994).

La infección respiratoria no complicada producida por el virus PI3 tiene un curso clínico de 3 a 4 días, siendo habitual la recuperación completa. Sin embargo, la verdadera importancia de esta infección en vacas deriva de su intervención en la neumonía enzoótica o fiebre de embarque (Fenner, 1992; Murphy et al, 1999).

Para controlar la fiebre de embarque se utilizan antibióticos que permiten controlar las infecciones bacterianas secundarias y vacunas.

Existen vacunas atenuadas e inactivadas de virus PI3 de aplicación intranasal o parenteral, que inducen la producción de anticuerpos IgA, éstas generalmente se administran junto con otros antígenos, por ejemplo virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, adenovirus bovino y virus de la diarrea viral bovina.

Las vacunas contra paramyxovirus, deben inducir la síntesis de anticuerpos contra la proteína F y HN para lograr una eficacia máxima (Fenner, 1992; Ernst, 1994; Lamb y Kolakofsky, 1996).

En México, son pocos los ensayos que se han llevado a cabo en vacunas contra PI3.

2.- RABIA

A.- EPIZOOTIOLOGÍA

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda y mortal. Afecta principalmente al sistema nervioso central, generalmente el virus entra al organismo por la mordedura de un animal rabioso.

Sinonimia: Hidrofobia, Derriengue, Derregado, Tronchado, Huila, Encéfalomielitis bovina (Flores, 1996).

Esta enfermedad afecta a todos los animales de sangre caliente, por lo general, los animales se infectan con el virus de la rabia como consecuencia de una mordedura profunda por un animal infectado que libera los virus a través de la saliva. Con menor frecuencia la infección es por contaminación de una herida abierta o un rasguño, los animales también se infectan por la ingestión de animales muertos que sufrieron la enfermedad. La transmisión trasplacentaria o durante la lactancia también ocurre en ciertas especies salvajes. La infección iatrogénica ha ocurrido después del tratamiento de carnes contaminadas y trabajos en el laboratorio.

El período de incubación del virus de la rabia varía desde nueve días hasta más de un año, pero como sucede en el hombre y en otros animales susceptibles hay una gran variedad.

El curso clínico de la enfermedad puede dividirse en tres fases: prodrómica, furiosa y parálitica.

A veces sólo se observa la de excitación, convulsiones y muerte; ésta corresponde a una presentación sobreaguda de la enfermedad. En otras ocasiones se observan cambios prodrómicos que consisten en ligeros cambios en el temperamento. Después habrá agresividad, etapa que corresponde al mayor peligro de transmisión de la rabia, ya que al morder transmiten la enfermedad. También se puede observar que los animales dan la impresión de que están atrapando objetos imaginarios.

En la forma furiosa se observa inquietud, nerviosismo y los animales en esta etapa evitan a las personas y se esconden en sitios oscuros. Muestran una respuesta exagerada a los estímulos luminosos o sonoros. Se hacen evidentes la excitabilidad, la fofobia y la hiperestesia. También persigue insectos y objetos imaginarios. En este periodo aumenta la inquietud y el animal comienza a moverse y a vagar sin propósito, volviéndose cada vez más irritable y depravado; en este periodo el animal es muy peligroso debido a su tendencia a morder todo lo que encuentra, sea hombre, animal u

objeto inanimado. En la mayoría de los casos hay un cambio característico en el ladrido causado por parálisis de la musculatura laríngea. Hay dificultad para deglutir debido a los espasmos, y posteriormente a la parálisis de los músculos de la deglución y los faríngeos, haciendo que escurra saliva del hocico del animal. A veces la rápida respiración por la boca causará que la saliva tenga aspecto espumoso. Los ataques convulsivos y la incoordinación muscular se hacen evidentes hacia el final de esta etapa, lo mismo que una mirada lejana. Si el animal no muere en uno de los ataques convulsivos entra en la etapa paralítica, durante la cual la enfermedad progresa de incoordinación muscular a parálisis de todo el cuerpo, después al coma y a la muerte.

Es de gran importancia la observación de que algunos perros y animales salvajes pueden recuperarse de la rabia clínica y pueden continuar liberando virus en su saliva (Flores, 1996).

La rabia es casi siempre fatal en los animales domésticos y a causa de la gran amenaza que implica su exposición para el ser humano y los animales.

Los animales rabiosos deben ser sacrificados humanamente tan pronto como aparecen los signos clínicos, los intentos por prolongar la vida del animal no son aconsejables.

La vacunación solo tiene valor profiláctico; el suero hiperinmune antirrábico, junto con la vacunación, sirven para combatir y prevenir la enfermedad (Flores, 1996; Victor y Ropper, et al, 2002).

B.- ETIOLOGIA:

Los virus de la familia Rhabdoviridae (incluidos en el orden de los Mononegavirales) son quizás los más ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que infectan a vertebrados, invertebrados y plantas; los que infectan a los mamíferos se han clasificado en tres géneros: el de los Vesiculovirus, con el virus de la estomatitis vesicular como virus tipo, el de los Ephemerovirus con el virus de la fiebre efímera bovina como virus tipo y el tercer

género representado por los Lyssavirus, con el virus de la rabia como virus tipo (Wagner & Rose, 1996; Wunner et al, 1994; Murphy et al, 1995). El virus de la rabia presenta forma de bala, con un diámetro de 75 nm y una longitud de 100 a 300 nm. Su genoma mide aproximadamente 12 Kb y es no segmentado. Estos virus de la rabia están constituidos por dos unidades estructurales y funcionales: una nucleocápside y una envoltura. Los componentes de la nucleocápside son: el ácido nucléico ARN, la proteína L que corresponde a la polimerasa viral, la proteína N y la proteína NS que es una fosfoproteína asociada a la nucleocápside, la nucleocápside tiene simetría helicoidal, constituida por una cadena de ARN de polaridad negativa (lo que significa que el genoma no puede ser traducido directamente a proteínas virales por los ribosomas, sino que debe haber una transcripción previa para producir ARN mensajero).

La envoltura por su parte está formada por la proteína M o de matriz y por la G que es la más externa (Coll et al, 1995; Montaña et al, 1995).

Cada una de las cinco proteínas estructurales del virus de la rabia (L, N, NS, M y G) es codificada por un gen del genoma viral (Tordo et al, 1995). La proteína N constituye el 90 % de la nucleocápside y está formada por 450 aminoácidos, la secuencia de éstos es poco variable de un aislamiento a otro, a diferencia de la proteína G que es muy variable (Tordo et al, 1995). La función de la proteína N del virus de la rabia, parece ser la de proteger al genoma viral de los ataques enzimáticos externos, además de conferirle una estabilidad funcional adecuada. La proteína N es la primera en ser sintetizada durante la replicación, además de ser la que se produce en mayor cantidad (Montaña et al, 1995; Chenik et al, 1994; Minamoto et al, 1994). Esta proteína N es altamente inmunogénica y es la que se inmunoprecipita en mayor cantidad utilizando sueros provenientes de animales y humanos vacunados con vacunas producidas en tejido nervioso, por lo que esta proteína es utilizada en una gran variedad de pruebas diagnósticas (Minamoto et al, 1994).

Desde principios de la presente década, se hicieron estudios sobre la capacidad de la proteína N del virus de la rabia para inducir la producción de anticuerpos y se llegó a la conclusión de que esta proteína no es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (Lodmell et al, 1993; Takita et al, 1993). Sin embargo, no obstante que esta proteína N no produce anticuerpos neutralizantes si confiere protección al desafío (Montaño et al, 1995; Lodmell et al, 1991; Lodmell et al, 1993; Fekadu et al, 1992). Lafon y colaboradores demostraron que la proteína N es un superantígeno que favorece la producción de anticuerpos neutralizantes anti-proteína G por las células presentadoras de antígeno (Lafon et al, 1987). Más aún, este mismo grupo publicó (Astoul et al, 1996) que la proteína N es un adyuvante eficaz, capaz de aumentar dramáticamente la respuesta específica de linfocitos B y T, contra un antígeno heterólogo como el virus de influenza humana inactivado. Estos autores precisan que el superantígeno (proteína N), actúa como un adyuvante que estimula a las cadenas V β (sistema murino) en forma específica. Si bien se han hecho estudios que demuestran a nivel de laboratorio que la proteína N del virus de la rabia es un adyuvante fuera de serie para promover la respuesta inmune contra el virus de influenza humana; hasta el momento no se ha probado su eficacia en vacunas vírales de importancia en medicina veterinaria. Con estos antecedentes, en esta tesis se pretendió probar la eficacia de la proteína N del virus de la rabia como inmunomodulador contra un virus similar al utilizado por Lafon y sus colaboradores (Astoul et al, 1996).

C.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUPERANTIGENOS (SAg).

Los superantígenos (SAg) son proteínas vírales o bacterianas que actúan como un potente estimulante para los linfocitos T, y en consecuencia para la respuesta inmune general del hospedero (Huber, 1996). Esta estimulación resulta de los SAg con el receptor de los linfocitos T (TCR) y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) (Fields et al, 1996). Se ha observado mediante estudios de

cristalografía con rayos X que el sitio de unión del SAg, el péptido del CMH y el TCR se sobreponen, ya que el SAg actúa como una cuña entre la región V de la cadena β ($V\beta$) del TCR y la molécula del CMH para desplazar el péptido antigénico lejos del sitio de la combinación del TCR. En esta forma el SAg es capaz de evitar el mecanismo normal para la activación de linfocitos T por complejos CMH/péptido específico (Fields et al, 1996; Tizard et al, 1998)

III.- JUSTIFICACION

Las propiedades de la proteína N del virus de la rabia de potenciar la respuesta inmune contra este agente y otros virus similares (ARN polaridad negativa) como el virus de la influenza humana(Astoul et al, 1996; Astoul et al, 1997) permite pensar en esta molécula como un inmunomodulador eficaz para vacunas contra parainfluenza-3, enfermedad que representa un serio problema para la industria pecuaria del país.

IV.- HIPOTESIS:

La proteína N del virus de la rabia aumentará la respuesta inmune humoral de hámsters inoculados contra parainfluenza 3 bovina, cuando es usada en combinación con esta vacuna.

V.- OBJETIVOS:

Determinar si la proteína N del virus de la rabia aumenta la repuesta inmune humoral de los hámsters al ser empleada en combinación con la vacuna experimental de parainfluenza 3 bovina.

Determinar la dosis de proteína N que promoverá mejor respuesta inmune humoral en los hámsters vacunados contra PI3 bovina.

VI.- MATERIAL Y METODOS:

Fase I. Producción y purificación de la proteína N.

Se infectaron 18 botellas T150 de células BHK-21, con 5 ml de virus rábico (10 a la 6 DL 50% en ratón de 21 días) cepa PV por botella, las cuales se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con solución salina fosfatada (PBS) estéri (Perrin et al, 1996).

Se separaron los monoestratos con perlas de vidrio estériles y PBS. Se colocaron las células de todas las botellas en un tubo y se centrifugaron a 500 g. durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y se suspendió el sedimento celular (dos veces más). Posteriormente se adicionó agua destilada al sedimento celular y se dejó en contacto para luego macerar y centrifugar. El sobrenadante se centrifugó a 4500 g durante 10 min a 4°C.

Para la purificación se colocaron 4 g de cloruro de cesio en un tubo de centrifuga y se le adicionó el sobrenadante que contiene la proteína N, se agitó hasta disolverlo, y se equilibró con sacarosa al 70 %. Se centrifugó durante 24 h a 150000 g. a 4 °C, al finalizar la centrifugación se obtuvo la banda que correspondió a la proteína N, y se dializó contra amortiguador de Tris – Cloruro de sodio (NT) pH 7.5, durante 24 h (Montaña et al, 1995). Una vez obtenida la proteína N se cuantificó mediante el método de Lowry, 1971.

Se realizaron geles de poliacrilamida (PAGE) al lote de proteína N producido con el propósito de corroborar su pureza (Westermeler et al, 1997).

Fase II. Producción de la vacuna experimental de parainfluenza 3 (PI 3).

La vacuna fue elaborada en el CENID-Microbiología, a partir de una cepa de campo, la cual fué replicada en cultivos celulares de la línea MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), inactivada con β -propiolactona (Alvarado et al, 1997).

Fase III. Determinación de la dosis adecuada de proteína N, en los grupos de Hámster.

Las dosis de proteína N que se agregaron a los diferentes grupos de vacuna de PI3 fueron:

Grupo 1: Se aplicó 20 µg de proteína N tres días antes de la vacunación con PI3.

Grupo 2: Se aplicó la vacuna de PI3 adicionada con 20 µg de proteína N.

Grupo 3: Se aplicó la vacuna de PI3 adicionada con 20 µg de proteína N más adyuvante incompleto de Freund (AF).

Grupo 4: Se aplicó la vacuna de PI3 adicionada con 40 µg de proteína N.

Grupo 5: Se aplicó la vacuna de PI3 adicionada con 40 µg de proteína N más AF.

Grupo 6: Se aplicó la vacuna de PI3 adicionada con 20 µg de proteína N recombinante obtenida de un sistema en baculovirus (N – Bac.)

Grupo 7: Se aplicó la vacuna experimental de PI3 sola.

Grupo 8: Testigo.

Cada grupo se conformó con cinco hámsters que se inocularon con 0.5 ml del tratamiento correspondiente, por vía intramuscular.

Se obtuvieron hámsters en México D.F. libres de patógenos específicos, de una edad de 28 días, peso de 45 gr. de sexo masculino.

Se realizaron sangrados en los días 0 (antes de vacunar), 7, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 postvacunación (pv).

Fase IV. Determinación de la respuesta humoral.

Para la determinación del título de anticuerpos, se realizó la prueba de seroneutralización en placa, según la describe Alvarado et al, 1997. Brevemente, se hicieron diluciones dobles del suero problema, desde 1:2 hasta 1:128, a las que se adicionó el virus de parainfluenza 3, a una concentración de 50-300 TCID (Tissue culture

infection dose) 50 %; se agregó una suspensión de células MDBK, a una concentración de 300,000 cel/ml. Se consideró como positivos a los sueros que desde la dilución 1:2 neutralizaron al virus, con base en los requerimientos que marca el CFR la SARH.

Fase V. Desafío de los diferentes grupos de Hámsters.

El desafío de los hámsters se realizó a los 150 días por el método de nebulización con una cepa patógena del virus de PI3, con título de $10^{5.7}$ poniendo una cantidad de 10 ml de virus en una cámara de nebulización. Los animales de los diferentes grupos se expusieron durante 30 min al desafío viral. Al tercer día posdesafío (pd) se sacrificaron dos hámsters de cada grupo para realizar la necropsia. Se extrajeron los pulmones que se lavaron, se tomó un fragmento de 1 cm^2 que se trituró en un mortero utilizando medio mínimo de Eagle (MEM 1x). el sobrenadante se inoculó en células MBDK sembradas previamente en cajas de 24 pozos para cultivo celular. Las placas se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 hr.

Los hámsters restantes se sacrificaron al sexto día después de la exposición al virus, y se repitió el procedimiento anterior.

Análisis estadístico.

Este análisis fue realizado mediante el programa SAS, por el método: Bloques al azar

El paquete SAS (Statistical Analysis System) es un sistema de programas para el análisis de datos. Consiste de un conjunto de módulos capaces de entregar resultados de diferentes procesos como regresión, análisis de varianza, estadística básica, distribución de frecuencias, procedimientos multivariados.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE LA PROTEINA N.

La proteína N obtenida de cultivo celular infectado y la obtenida de un sistema recombinante en Baculovirus fueron donadas por la M en C. Elizabeth Loza Rubio (2003).

La cantidad de proteína N, que contuvo cada tratamiento, se determino por lowry.

DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL.

La respuesta inmune humoral de los hámsters producida por los diferentes tratamientos aplicados, se determinó por la prueba de seroneutralización en placa.(Alvarado et al, 1997)

En todos los grupos se produjo una respuesta inmune humoral positiva, en comparación con el grupo control. Sin embargo, el tratamiento que produjo la mayor respuesta humoral ($p < 0.05$) fue el grupo 6 que contuvo 20 μg de proteína N del virus de la rabia expresado por un baculovirus recombinante (N Bac). En este grupo los anticuerpos se detectaron desde el día siete posvacunación (pv) comenzando a declinar al día 120 pv; en el 7° sangrado sólo un animal de los cinco inoculados presentó anticuerpos. (tabla 1).

Tabla 1. Título de anticuerpos antiviral de PI3, medido por seroneutralización después de inmunizar hamsters con una vacuna experimental de PI3 bovina adicionada con 20 μg de N-Bac.

Animal	Día 7 pv	Día 30 pv	Día 45 pv	Día 60 pv	Día 90 pv	Día 120 pv	Día 150 pv
1	-	-	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4
2	-	1:2	1:2	1:4	1:2	1:4	-
3	1:4	-	1:4	1:2	-	-	-
4	1:2	1:2	1:2	1:2	1:4	-	-
5	1:4	-	1:2	-	1:8	-	HM

- No se detectaron anticuerpos

HM Hámster muerto

De igual manera el grupo 1 al que se inocularon 20 µg. de proteína N obtenida de cultivo celular infectado tres días antes de la vacunación contra PI3 resultó estadísticamente significativo ($p < 0.05$), los anticuerpos se presentaron desde el día siete, aunque sólo se detectaron en dos animales. Uno de ellos presentó el título más alto (1:16) en todo el tiempo que perduró el experimento (150 días). Sin embargo, a los 90 días los anticuerpos comenzaron a declinar y a los 120 días ya que no se detectó ninguna respuesta humoral. (tabla 2).

Tabla 2. Título de anticuerpos de antivirio de PI3, medido por seroneutralización después de inmunizar hámsters con una vacuna experimental de PI3 bovina adicionada con 20 µg de proteína N inyectada tres días antes de la vacunación.

Animal	Día 7 pv	Día 30 pv	Día 45 pv	Día 60 pv	Día 90 pv	Día 120 pv	Día 150 pv
1	-	1:2	1:2	1:4	-	HM	HM
2	1:16	1:4	1:2	1:4	-	HM	HM
3	-	-	1:2	1:2	1:2	HM	HM
4	-	1:2	1:2	1:2	HM	HM	HM
5	1:2	-	NT	1:2	HM	HM	HM

- No se detectaron anticuerpos

HM Hámster muerto

NT No trabajado

En el grupo 7 inyectado con la vacuna experimental contra PI3 bovina, los anticuerpos se detectaron a partir el día 30 en un sólo animal. La respuesta más consistente se detectó al día 45 en el cual todos los animales presentaron títulos entre 1:2 y 1:4, no obstante a la siguiente lectura los anticuerpos comenzaron a descender paulatinamente hasta el día 150. (tabla3).

Tabla 3. Título de anticuerpos antiviral de PI3, medido por seroneutralización después de inmunizar hamsters con una vacuna experimental de PI3 bovina inyectada el primer día.

Animal	Día 7 pv	Día 30 pv	Día 45 pv	Día 60 pv	Día 90 pv	Día 120 pv	Día 150 pv
1	-	-	1:4	-	1:2	1:2	1:2
2	-	-	1:4	-	-	1:2	-
3	-	1:4	1:2	1:4	1:2	-	-
4	-	-	1:2	1:4	1:2	-	HM
5	-	-	1:2	-	-	HM	HM

- No se detectaron anticuerpos

HM Hámster muerto

El grupo 3 inoculado con el tratamiento que contenía 20 µg de proteína N más adyuvante incompleto de Freund (AIF), los anticuerpos se detectaron en algunos casos desde el día siete pv, lo que permaneció constante hasta el día 90, posteriormente no se presentaron anticuerpos. En los muestreos ulteriores dos animales murieron, sin que se estableciera la razón de la muerte. (tabla 4).

Tabla 4. Titulo de anticuerpos antivirus de PI3, medido por seroneutralización después de inmunizar hámster con una vacuna experimental de PI3 bovina adicionada con 20 µg de proteína N más adyuvante incompleto de Freund.

Animal	Día 7 pv	Día 30 pv	Día 45 pv	Día 60 pv	Día 90 pv	Día 120 pv	Día 150 pv
1	1:2	1:4	-	-	1:4	-	-
2	1:2	-	-	1:2	1:16	-	-
3	-	1:2	1:2	-	1:4	-	-
4	-	-	-	-	-	HM	HM
5	-	-	1:2	-	HM	HM	HM

- No se detectaron anticuerpos

HM Hámster muerto

Al utilizar como inmunomodulador 40 µg de proteína N mas AIF en la vacuna de PI3 grupo 5, los anticuerpos únicamente se detectaron al día 45 y 60 en la mayoría de los animales. A partir del 5° sangrado la respuesta humoral ya no se manifestó.(tabla 5).

Tabla 5. Título de anticuerpos antivirus de PI3, medido por seroneutralización después de inmunizar a hámsters con una vacuna experimental de PI3 bovina adicionada con 40 µg de proteína N más adyuvante incompleto de Freund.

Animal	Día 7 pv	Día 30 pv	Día 45 pv	Día 60 pv	Día 90 pv	Día 120 pv	Día 150 pv
1	-	-	-	1:16	-	-	-
2	-	-	1:2	1:4	-	-	-
3	-	-	1:2	1:16	-	-	-
4	-	-	1:2	1:4	-	-	-
5	-	-	1:2	-	-	-	-

- No se detectaron anticuerpos

En la tabla 6 puede observarse la respuesta en el grupo 2 producida al agregar 20 µg de proteína N del virus de la rabia a la vacuna de PI3, en estos animales se detecto que desde el día siete hasta el día 60 existieron anticuerpos; sin embargo del día 90 en adelante ya no fue posible detectarlos.(tabla 6).

Tabla 6. Título de anticuerpos antiviral de PI3, medido por seroneutralización después de inmunizar hámsters con una vacuna experimental de PI3 bovina adicionada con 20 µg de proteína N del virus de rabia.

Animal	Día 7 pv	Día 30 pv	Día 45 pv	Día 60 pv	Día 90 pv	Día 120 pv	Día 150 pv
1	-	-	1:2	1:8	-	-	-
2	-	1:2	1:2	1:8	-	-	-
3	1:2	1:2	1:2	-	-	-	HM
4	1:4	-	-	-	-	-	HM
5	-	-	-	-	-	-	HM

- No se detectaron anticuerpos

HM Hámster muerto

Con el uso de 40 µg de proteína N a la vacuna de PI3 en el grupo 4, se detectaron anticuerpos desde el día 30, hasta el día 90. Después del 6° sangrado, los anticuerpos no se detectaron. (tabla 7).

Tabla 7. Título de anticuerpos antiviral de PI3, medido por seroneutralización después de inmunizar hámsters con una vacuna experimental de PI3 bovina adicionada con 40 µg de proteína N.

Animal	Día 7 pv	Día 30 pv	Día 45 pv	Día 60 pv	Día 90 pv	Día 120 pv	Día 150 pv
1	-	-	1:2	-	-	-	-
2	-	1:2	-	1:2	1:2	-	-
3	-	-	1:2	-	1:8	-	-
4	-	-	-	1:4	1:4	-	-
5	-	1:2	-	-	-	-	HM

- No se detectaron anticuerpos

HM Hámster muerto

En el grupo testigo, inoculado con medio mínimo de Eagle no se detectaron anticuerpos en ninguno de los casos.

En la tabla 8 se observan los promedios de los títulos de anticuerpos promovidos por los diferentes tratamientos utilizados. El tratamiento que mayor respuesta humoral produjo fue el que contenía 20 µg de proteína N recombinante expresada por un Baculovirus recombinante, cuyo promedio es de 0.600; el siguiente tratamiento en promoción de anticuerpos fue en el que se aplicó 20 µg de proteína N obtenida de cultivo celular infectado, inoculado tres días antes de la vacunación, cuyo promedio fue de 0.560. Los tratamientos restantes presentaron los siguientes promedios, la vacuna sola tuvo un promedio de 0.390; al que se adicionó 20 µg de proteína N más AIF, el promedio fue 0.350; el que contenía 40 µg de proteína N más AIF presentó un promedio de 0.320. En los tratamientos con 20 µg y 40 µg de proteína N, el promedio fue de 0.280.

Tabla 8. Promedio del título de anticuerpos generados por los diferentes tratamientos.

Grupos	Promedios \pm e.e.m.
1.-Aplicación de 20 μ g de proteína N, 3 días antes de la vacunación de PI3.	0.560; \pm 0.120 **
2.- Vacuna de PI3 más 20 μ g de proteína N,	0.280; \pm 0.100
3.- Vacuna de PI3 más 20 μ g de proteína N más AIF.	0.350; \pm 0.100*
4.- Vacuna de PI3 más 40 μ g de proteína N.	0.280; \pm 0.100
5.- Vacuna de PI3 más 40 μ g de proteína N más AIF.	0.320; \pm 0.090
6.- Vacuna de PI3 más 20 μ g de proteína N. Baculovirus recombinante.	0.600; \pm 0.090**
7.- Vacuna de PI3 sola.	0.390; \pm 0.100*
8.- testigo.	-0.000; \pm 0.090

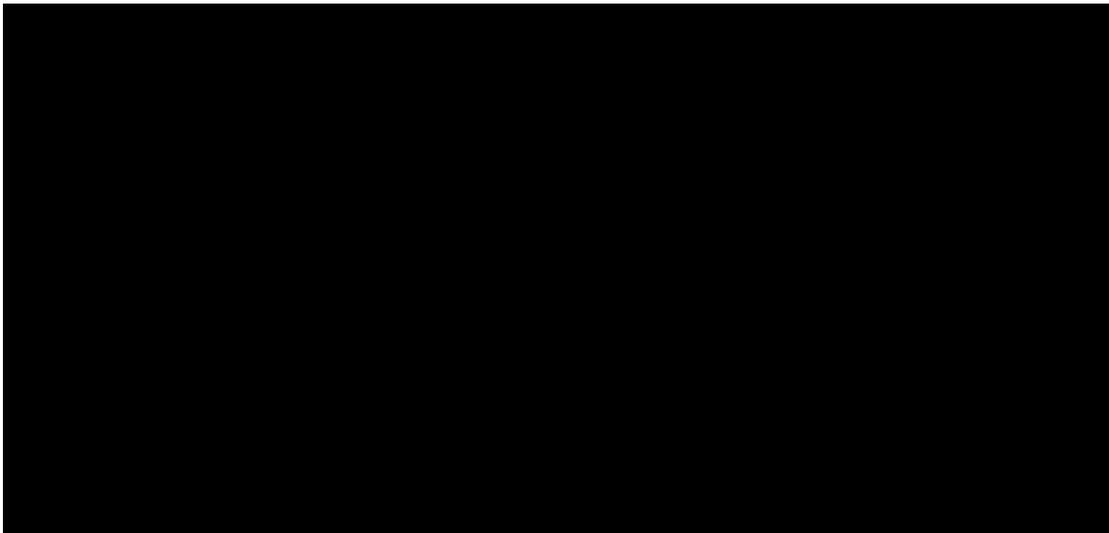
* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

e.e.m error estándar de la media

En la gráfica 1 se observan los promedios de los títulos de anticuerpos en relación a la fecha de sangrado realizado a los animales de los diferentes grupos, así se tiene que en el día 60 (4to sangrado) se presenta el promedio más alto, el cual fue de 0.710, a éste le continúa el 3er sangrado que fue en el día 45, con un promedio de 0.460, el siguiente sangrado que continúa es el 5to realizado el día 90 ya que promedio 0.360, en los sangrados 1 y 2 tenemos promedios similares de 0.250, a éste le sigue el 6to sangrado realizado el día 120 el cual presentó un promedio de 0.220, y el de menor promedio que fue el 7mo sangrado que se realizó el día 150 con 0.110 de promedio. Aquí observamos que en el día 60 (4to sangrado) es donde mayor respuesta humoral presentaron todos los grupos, siendo este sangrado la punta de mayor alcance de anticuerpos por los animales. (grafica 1)

Grafica 1. Curva de la respuesta humoral contra el día de sangrado



DESAFIO DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE HAMSTERS

El desafío de los hámsters se llevo a cabo el día 150 pv. Posterior a ello, dos animales de cada grupo se sacrificaron a los días 3 y 6 posdesafio (pd) para tomar muestras de sus pulmones. Cada muestra se lavó y trituró para después inocularse en células MBDK.

Al realizarse la lectura a las 72 hrs de incubación, se observó efecto citopático positivo en todos los grupos excepto en el 6 (tabla 9.1).

A las 144 hrs (sexto día) el efecto citopático se observó similar al de las 72 hrs. (Tabla 9.2).

El grupo 1 no se presenta en las tablas ya que los hámsters habían muerto, al igual que en el grupo, 2 y 8 ya no se presentan en la tabla 2.

Tabla 9.1. Presentación del efecto citopático producido en los diferentes grupos de experimentación a las 72 hrs en las células MBDK inoculadas con macerado de pulmón de hámster de los diferentes grupos.

Grupo	Efecto citopático
2	+
3	+
4	+
5	+
6	-
7	+
8	+

Tabla 9.2. Presentación del efecto citopático producido a las 144 hrs (sexto día) en las células MBDK inoculadas con macerado de pulmón de hámster de los diferentes grupos.

Grupo	Efecto citopático
3	+
4	+
5	+
6	-
7	+

DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar la proteína N del virus de la rabia como un posible inmunomodulador en vacunas monovalentes contra el virus de parainfluenza -3, que afecta a los bovinos y ovinos y que representa un serio problema para la industria pecuaria del país, pues esta enfermedad continúa siendo un gran problema en los hatos y para la economía del productor. El virus de PI3 junto con otros virus del complejo respiratorio predisponen la invasión de bacterias, como *Pasteurella*, *Mainemia* y *Haemophilus*, a las vías respiratorias provocando la enfermedad. (Peter J. K. Durham et al, 1991; G. C. Duff, M. L. Galyean, L. J. Perino et al, 2000; Ronal L. Cravens and David Bechtol et al, 1991)

En los trabajos realizados con la proteína N del virus de la rabia como inmunomodulador se han obtenido títulos de anticuerpos adecuados para la protección contra el virus de influenza humana , influenza aviar y otros agentes (Powers and Belshe, 1993; Astoul; Loza Rubio, 2003) los cuales son virus similares al de PI3; esto nos motivó a realizar el presente trabajo utilizando la vacuna experimental de PI3 bovina, arrojando buenos resultados en respuesta humoral en los diferentes grupos de hámsters; los grupos con mayor respuesta inmunológica fueron los que se inocularon con 20 µg de proteína N.

En este estudio se examinó la respuesta serológica de ocho grupos de hámsters inoculados con una vacuna experimental de PI3 adicionada con diferentes cantidades de proteína N del virus de la rabia.

Se observó que la vacuna de PI3 que contenía 20 µg de proteína N expresada por un sistema Baculovirus recombinante, al igual que la vacuna que contenía 20 µg de proteína N aplicada tres días antes de la vacunación presentaron la mayor respuesta humoral, la cual se detectó mediante la prueba de seroneutralización en placa. Muy probablemente el efecto producido por la proteína N obtenida en un sistema recombinante de Baculovirus

(N-Bac), se debió a que este sistema produce una alta expresión de la proteína y que una proteína recombinante obtenida mediante Baculovirus conserva la propiedad de producir modificaciones post-traduccionales; aunque Astoul (1997) y Loza Rubio (2003) no encontraron diferencias al usar proteína N obtenida de cultivos celulares ó N-Bac.

El efecto de promoción de anticuerpos al aplicar la proteína N tres días antes de la vacunación puede explicarse debido al hecho que los SAg son potentes inductores de las células T, por lo que aparentemente usada de esta manera cuando se inyecta algún antígeno vacunal las células del sistema inmune ya se encuentran activadas. Esto mismo fue observado por Okamoto et al, 2001 que utilizo la enterotoxina B de *Staphilococcus aureus* (SEB) aplicada uno y dos días antes de aplicar una vacuna de *Lysteria monocytogenes*, demostró conferir protección a ratones desafiados contra esta bacteria.

El título de anticuerpos producido por los hámsters puede hacer suponer que la vacuna esta protegiendo a los animales; sin embargo, la respuesta humoral puede verse afectada por la cepa de virus contenida en la vacuna. (Mc Elhaney et al, 1998).

En otros trabajos realizados con ratones y aves se observó que la inclusión de 20 µg de proteína N es la dosis que incrementó el porcentaje de protección (Astoul, 1996; Drings, 1999; Loza-Rubio, 2002). En otras especies (ratones y humanos) este efecto adyuvante se ha explicado por la estimulación inespecífica de las células T cooperadoras por las cadenas Vβ del receptor de células T. A pesar de que los SAg se han involucrado con enfermedades inmunes, en este trabajo nos enfocamos a valorar el efecto inmunoestimulante de la proteína N del virus de la rabia, que aunque es un SAg, se reporta como un mitógeno débil, a diferencia de los SAg bacterianos que se involucran con intoxicaciones alimentarias y desórdenes autoinmunes, entre otros ya que inducen cantidades elevadas de IL2; sin embargo tanto Astoul(1996) como Loza Rubio (2003) demostraron que el SAg del virus de la rabia es un débil inductor de la IL2.

La vacuna de PI3 con proteína N del virus de la rabia ha dado resultados alentadores en los hámsters para la protección contra PI3 bovina, gracias a esto tenemos otra arma más para seguir investigando sobre aspectos relacionados al control de esta enfermedad respiratoria y así estaremos bajando la tasa de morbilidad y mortalidad de los animales. (Ronald L. Cravens and David Bechtol et al, 1991).

De acuerdo a los resultados obtenidos con hámsters en el presente trabajo, la respuesta de anticuerpos fue adecuada. Esto abre una alternativa para ser usada en el ganado, lo que nos llevaría a tener efectos benéficos en ganancia de peso y en el consumo de alimento, esto tomando en cuenta otros trabajos que han controlado a las enfermedades respiratorias para así obtener mejores beneficios. (G. C. Duff, M. L. Galyean, L. J, Perino et al, 2000)

Esta vacuna de PI3 sería recomendable probarla en bovinos para saber con exactitud si es eficiente para provocar una respuesta humoral adecuada en el ganado, ya que en esta especie, así como en ovinos encontramos muchos problemas de morbilidad y mortalidad por problemas respiratorios. En trabajos realizados por Rodger en la prevención de las enfermedades respiratorias con vacunas los a llevado a controlar la morbilidad y mortalidad en ovinos. (J. L. Rodger et al, 1989).

En el desafío de los hámsters los grupos que presentan efecto citopático se debe a la invasión del virus de PI3 a las células, ya que las muestras tomadas de los animales donde no se detectaron un nivel de anticuerpos adecuados se presentó el efecto citopático. El único grupo capaz de evitar este efecto en las células fue el seis, el cual contenía 20 µg de proteína N expresada por un sistema de Baculovirus recombinante, el cual suponemos neutralizó al virus debido a la presencia de anticuerpos en el suero de los hámsters.

En el desafío de los hámsters obtuvimos datos significativos para poder apreciar el efecto inmunomodulador de la vacuna de PI3 con sus diferentes dosis de proteína N ya

que en este desafío se utilizó el virus de PI3 puro y se expuso directamente por las vías respiratorias de los hámsters. La respuesta que buscamos solo se presentó en el grupo seis, ya que fue el único que no presentó efecto citopático en el cultivo de células MBDK, no obstante podemos decir que por esto el virus no atacó al animal, ya que tenía defensas adecuadas, sin embargo los demás grupos sí presentaron efecto citopático en las células MBDK. Lo que nos indica que no tenían las defensas adecuadas como para detener el efecto citopático en las células MBDK.

Los diferentes grupos de hámsters no presentaron los síntomas significativos de la enfermedad, tal vez se deba a todos los factores que implica el complejo respiratorio para que se presente como enfermedad.

Podemos poner varios factores que hayan intervenido en la recuperación de los hámsters después de la exposición al virus de PI3, uno de ellos es la propia vacuna que estamos utilizando, ya que en todos los grupos presentaron una respuesta inmune contra este virus como lo observamos en los resultados de la prueba de seroneutralización en placa, no al cien por ciento pero sí pudo haber intervenido en esta respuesta. Otro factor es que el virus por sí solo es difícil que provoque la enfermedad, ya que requiere de la asociación de bacterias y micoplasmas y de un medio ambiente adverso que provoque al animal depresión de su sistema inmunológico. Las condiciones en que estaban los animales eran las más adecuadas, teniendo un hábitat lo más cómodo para ellos, al igual que la alimentación, aunque nunca descartamos que el hecho de estar confinados no provoque un estrés.

En los resultados de los diferentes grupos tenemos que el mejor es el grupo N-Bac. Y el grupo que se aplicó la vacuna tres días antes de la vacuna, por lo que tenemos que estas vacunas son mejores que la vacuna sola, por estos resultados podemos decir que vale la pena tomar en cuenta la proteína N como un adyuvante que pueda aumentar la protección contra esta enfermedad.

Los hámsters murieron por el traumatismo provocado por la aguja al realizar el sangrado ya que la punción era intra cardíaca, lo que pudimos lesionar al corazón y a pulmones, esto lo confirmamos ya que en ocasiones la muerte era durante o después de la punción.

Sería necesario realizar ensayos complementarios con este adyuvante (proteína N) utilizado en la vacuna de PI3, como estudios de costo beneficio sobre la producción de la proteína N, e investigar si estas moléculas son incapaces de producir algún tipo de enfermedad autoinmune, como ocurre con los SAg bacterianos, a nivel histopatológico y molecular. Además esta vacuna requiere ser probada en el ganado, para saber si es eficiente para producir una respuesta inmunológica adecuada, como sucede con los hámsters en el laboratorio.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se concluyó que la proteína N del virus de la rabia utilizada como adyuvante en la vacuna de PI3 provoca una respuesta inmunológica en animales de laboratorio (hámsters). Con 20 µg de proteína de Baculovirus recombinante se indujo una respuesta humoral rápida, consistente y detectable hasta después de cuatro meses. Asimismo la inyección de 20 µg de proteína N tres días antes de la inoculación de la vacuna de PI3 produjo resultados alentadores; esta respuesta puede explicarse porque la acción inmunomoduladora de la proteína N se ha explicado por ser un superantígeno.

La proteína N del virus de la rabia utilizada como inmunomodulador en la vacuna de PI3 dio resultados alentadores a la respuesta inmune humoral de hámster contra esta vacuna.

Las dosis con mejor resultados fueron la de 20 µg de proteína N usada tres días antes de la vacunación contra el virus de PI3, y al adicionar 20 µg de una proteína N del Baculovirus recombinante en comparación a la vacuna sola.

LITERATURA CITADA

- Alvarado I A , Mejia S P, De Paz V O, Labrandero I E, Aguilar A, Setien; Validación de la vacuna contra rinotraqueitis infecciosa Bovina (IBR) Cepa Texcoco en condiciones controladas. Técnica Pecuaria en México. Vol No 3 Septiembre-Diciembre de 1997.
- Astoul E., Lafage M., Lafon M., 1996. Rabies superantigen as V β T-dependent adjuvant. J. Exp. Med. 183:1623 – 1631.
- Astoul E., Lafage M., Lafon M., 1997. Rabies virus superantigen an adjuvant. International Rabies Meeting. Institut Pasteur-Paris. Pp. 2.05.
- Biberstein Ernst L.; Yuan Chung Zee; Tratado de Microbiología Veterinaria; Acribia; 1994; pp. 595 – 596.
- Bradford P Smith, DVM Diplomate, 1990. Large Animal Internal Medicine; The C.V Mosby Company; pp. 595 – 596.
- Coll J. M., The glycoprotein G of Rhabdoviruses., Arch. Virol., 1995, 140, 827 – 851.
- Collins PL, Chanok RM. McIntosh: Parainfluenza viruses in: Fields Virology, 3ra Edition. B. N. Edited by Fields DM. Knipe PM. Howley et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1177-1204 (Chapter 40). 1996.

- Chenik M., Chebli K., Gaudin Y., Blondel D., In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein., *J. Gen. Virol.*, 1994, 75, 2889 – 2896.
- Choppin PW, Scheid A. The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev infectc.* 40-61. 1980.
- Dietzchold B., Cox J. H., Schneider L.G., Wiktor T. J., Koprowski H., Isolation and purification of polymeric form of the glycoprotein of rabies virus., *J. Gen. Virol.*, 1978, 40, 131 – 139.
- Fekadu M., Sumner J.W., Shaddock J.H., Sanderlin D.W., Baer M. G., Sickness and recovery of dogs challenged with a street rabies virus after vaccination with vaccinia virus recombinant expressing rabies virus N protein., *J. Virol.*, 1992, 66 (5), 2601 – 2604.
- Fields BA., Malchioldi EL., Li H., Ysern X., Stauffacher CU., Crystal structure of a T cell receptor beta chain complexed with a superantigen. *Nature* 384: 188 – 192.
- Frank Fenner, Peter A Bachmann; 1992; *Virología Veterinaria*; Edición.- Acribia, S. A.; pp. 503 – 511.
- G. C. Duff, M.L. Galyean, L. J. Perino; Effects of Intranasal Versus Intramuscular Modified Live Vaccines and Vaccine Timing on Health and Performance by Newly Received Beef Cattle; *The Bovine Practitioner*, Vol. 34, No. 1; January, 2000; pp. 66 – 70.

- Galinski, M. S. 1991. Annotated nucleotide and protein sequences for selected Paramyxoviridae.; pp. 537 – 568. In: The Paramyxoviruses (Kingsbury, D. W. Ed.), Plenum, New York.
- Galinski, M. S. and Wechsler, S. L. 1991. The molecular biology of the Paramyxovirus genus. ; pp. 41 – 82. In: the Paramyxoviruses (Kingsbuki, D. W. Ed), Plenum, New York.
- Howard JG, Francis JT. The Paramyxoviridae. In Hagan and Bruners Infectious Diseases of Domestic Animals and Biologic Therapy. 7° Ed. Comstock Publishing Associates. Division of Cornell University Press. Ithaca and London. 747-751. 1981.
- Huber BT., Hsu PN., Sutkowski N., 1996. Virus encoded superantigens. Microbiol. Rev 60 : 473 – 482.
- J. L. Rodger; Parainfluenza 3 vVaccination of Sheep; The Veterinary Record ; Vol. 125; October 28 1989; pp. 453 – 456.
- J. Motha M. Hansen and D Orr; Viral aeriologies for bovine respiratory disease, New Zeland Veterinary Journal 45, 40, 1997.
- Kazataka OHSAWA, Akio YAMADA, Kaoru TAKEVCHI; Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from Guinea Pigs: Received 25 December 1997, accepted 22 April 1998.; pp. 919 – 922.

- Lamb RA, Kalakofsky D. Paramyxoviridae: The virus and their replication. In: Fields Virology, 3rd Edition. B. N. Edited by Fields, DM Knipe, PM Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996.
- Larski, Virologia para veterinarios 1989, Ediciones científicas; La Prensa Médica México S.A de Cv.; pp. 412 – 414.]
- Lodmell D. L., Esposito J. J., Ewalt L. C., Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro., J. Virol., 1993, 67 (10), 6080 – 6086.
- Lodmell D. L., Sumner J. W., Esposito J. J., Bellini W. J., Ewalt L. C., Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. J. Virol., 1991, 65 (6), 3400 – 3405.
- Loza Rubio E, Esquinel FG, Mercado SS, Banda RVM, Verdugo RA. Expresión del ARNm de IL2 en pollos vacunados con una vacuna inactivada de influenza aviar. Tec. Pec. Mex. 2003.
- Loza Rubio E. Utilización de la proteína N del virus de la rabia como inmunomodulador en vacunas de influenza aviar, y su evaluación inmunológica. Tesis de doctorado FMVZ – UNAM. 2003. pp 105.
- Minamoto N., Tanaka H., Hshida M., Goto H., Ito H., Naruse S., Yamamoto K., Sugiyama M., Kinjo T., Mannen K., Mifume K., Linear and conformational-dependent

antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus., *Microbiol. Immunol.*, 1994, 38 (6), 449 – 455.

- Mohanty SB, Dutta SK. *Veterinary Virology*. 3rd edition, Lea & Febiger 140-147. 1981.
- Montañó Hirose J. A., Lafage M., Lafon M., Measurement of rabies virus N protein in rabies vaccines., *Res. Virol.*, 1995, 146, 217 – 224.
- Murphy F A, Gibbs EPJ, et al . *Veterinary virology*, 3rd edition, Academic Press, 411-428 (Chapter 26), 459-468 (Chapter 30). 1999.
- Murphy FA, Fauquet CM., Mayo MA., Jarvis AW., Ghabrial SA., Sumner MD., Mortelli GP., Bishop DHL. *Classification and Nomenclature of Viruses*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (1995). *Archives of Virology*, (Win J). New York, Springer Verlag, 1995.
- Okamoto S, Kamabata S, Nakagama I, Hamada S. Administration of superantigen protects mice from lethal *Listeria monocytogenes* infection by enhancing cytotoxic cells. *Infection and Immunology*; 2001; 69; 6633 – 6642.
- Peter J. K. Durham, Lori E. Hassard, Jorce Van Donkersgoed; Serological Studies of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Parainfluenza 3, Bovine Viral Diarrhea, and Bovine Respiratory Syncytial Viruses in Calves Following Entry to a Bull Test Station; *Can Vet J* Volumen 32; July 1991; pp. 427 – 429.

- Pionaki Panigrahi and Sashi B. Mohanty Defective transport of hemaggtin-neuramidase glycoprotein of bovine parainfluenza – 3 virus in interferon treated cell; Virology September 12, 1989.; pp. 125 – 133.
- Research school of Biological sciences; Paramyxovirus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb//ICTVdB/48110000.htm>.
- Ronald L. Cravens and David Bechtol. Clinical response of feeder calves under direct IBR and BVD virus challenge: a comparison of two vaccines and negative control. Bovine Practitioner No. 26, 1991. pp 154 – 158.
- S. Riedeman T.M.G Reinhardt, M.V, Dr med vet: N Tadichi M.V, Ph D M Aguilar; Seroprevalencia de VDVB, VHB-1, PI-3 y VRSB en 12 predios lecheros de la provincia de Valdivia Chile; Arch Med Vet, XXVIII, No 1, 1996 ; pp. 121 – 123.
- Takita-Sonoda Y., Fujii H., Mifume K., Ito Y., Hivage M., Nizhizono A., Mannen K., Minamoto N., Resistance of mice vaccinated with rabies virus internal structural proteins to lethal infection., Arch. Virol., 1993, 132, 51 – 65.
- Tizard Ian R. ; Inmunología Veterinaria ; Quinta Edición McGraw-Hill Interamericana, S.A. de C.U., 2000; pp 121 – 131.
- Tordo N., Kouknetzoff A., The rabies virus genome: an overview., Onderstepoot J. Vet. Res., 1995, 60, 263 – 269.

- Wagner RR., Rose JK (1996). Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Fundamental Virology. (Fields DM), 3rd ed, Philadelphia. Raven Publishers. Pp. 1121 – 1135.
- Wunner EH., Calisher CH., Dietegen RG., Jackson Ao., Kitajama EW., Lafon M., Leong JC., Nichol ST., Peters D., Smith JS., Walker PJ., (1995). Rhabdoviridae. In: Classification and Nomenclature of viruses (Wien J), New York, Springer-Verlag.
- Z. Dinter and B Morein; 1991. Virus infections of Ruminants. Elsevier Vol 3; pp. 319 – 331.