



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DEL
EFECTO DE LA INFECCIÓN CON VIRUS DE LA RABIA SOBRE
LOS ASTROCITOS DE LA CORTEZA CEREBRAL EN RATONES**

Andrea del Pilar Hurtado Cruz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias
Bogotá, Colombia
2018

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DEL EFECTO DE LA INFECCIÓN CON VIRUS DE LA RABIA SOBRE LOS ASTROCITOS DE LA CORTEZA CEREBRAL EN RATONES

Andrea del Pilar Hurtado Cruz

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Neurociencias

Director:

Biólogo, MSc, Ph.D., Orlando Torres Fernández

Codirectora:

Lic en Biología, MSc, Ph.D., Zulma Dueñas Gómez

Línea de Investigación:

Vulnerabilidad Selectiva Neuronal

Grupo de Morfología Celular

Instituto Nacional de Salud

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2018

(Lema)

*En ti se halla oculto el tesoro de los Tesoros.
Oh! Hombre, concóctete a ti mismo y conocerás
el universo y a los Dioses.*

Oráculo de Delfos

Agradecimientos

A través de este documento expreso mi agradecimiento a las siguientes personas y entidades:

Al Doctor ORLANDO TORRES FERNÁNDEZ, director de tesis, por el apoyo permanente como docente desde mi etapa de estudiante de pregrado y la vinculación al Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud (INS).

A la Doctora ZULMA DUEÑAS GÓMEZ, por la codirección de este trabajo y su apoyo como docente de la Maestría en Neurociencias.

Al Biólogo Gerardo Santamaría Romero, del Grupo de Morfología Celular del INS, quien con su valiosa experiencia hizo aportes valiosos para el desarrollo de este trabajo.

A la doctora Ladys Sarmiento y demás compañeros del Grupo de Morfología Celular del INS por sus aportes individuales en diferentes actividades relacionadas con la tesis.

A la Estadística MSc, Adriana Morales Robayo, de la Universidad Nacional de Colombia.

Al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD por brindarme la oportunidad de completar mi formación profesional desde mi ingreso como estudiante de pregrado.

A COLCIENCIAS por la financiación de dos becas en el Programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA por contribuir con mi formación profesional integral a través del programa de la Maestría en Neurociencias.

Resumen

Los astrocitos están involucrados en la homeostasis del tejido nervioso y en la función neuronal; sin embargo, la investigación publicada en rabia hace poca referencia al efecto de la infección viral en estas células gliales. El objetivo de este trabajo fue describir la inmunorreactividad de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y de las proteínas vimentina y S100B, así como la ultraestructura celular de los astrocitos en la corteza cerebral de ratones en respuesta a la infección con el virus de la rabia. Ratones ICR de 28 días de edad fueron inoculados intramuscularmente (IM) o intracerebralmente (IC) con virus fijo CVS. Además, se evaluó el efecto de la infección secuencial primero por vía IM y luego de 48 h por la ruta IC. Los animales en fase terminal de la enfermedad se anestesiaron y se fijaron mediante perfusión intracardíaca con paraformaldehído o glutaraldehído. Se extrajeron los encéfalos y se procesaron para inmunohistoquímica y microscopía electrónica. La infección generó efectos diferenciales sobre la inmunorreactividad a GFAP dependiendo de la ruta de inoculación IM o IC. La expresión de GFAP se incrementó en los cerebros inoculados por vía IC y en los doblemente inoculados (IM-IC). La sola inoculación IM apenas generó una leve inmunorreacción. La infección produjo un notable aumento de la inmunotinción y el número de células inmunorreactivas a la proteína reguladora del calcio S100B. Además, los cerebros infectados con este virus reactivaron la expresión de vimentina, un marcador de neurodesarrollo. Este efecto fue más evidente en la corteza cerebral y el hipocampo. Por otro lado, en el ME no se encontraron partículas virales dentro de los astrocitos ni efecto sobre su ultraestructura. Estos resultados sugieren que los astrocitos pueden estar involucrados en la patogénesis de la rabia.

Palabras clave: Rabia, corteza cerebral, astrocitos, GFAP, vimentina, S100B.

Abstract

Astrocytes are involved in neuronal function and brain tissue homeostasis; however, research published in rabies makes little reference to the effect of this viral infection on astrocytes. The aim of this work was to describe the immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and S100B proteins, as well as the cellular ultrastructure of astrocytes in the mice cortex brain in response to infection with the rabies virus. ICR mice of 28 days of age were intramuscularly (IM) or intracerebrally (IC) inoculated with CVS fixed virus. In addition, the effect of IM an IC sequential infections was tested. The animals in terminal phase of the disease were anesthetized and brains fixed by intracardiac perfusion with paraformaldehyde or glutaraldehyde. The brain tissue were extracted and processed for immunohistochemistry and electron microscopy. The infection generated differential effects on the immunoreactivity to GFAP depending on the route of inoculation IM or IC. The expression of GFAP was increased in brains from both IC and double inoculated (IM-IC). The virus infection was associated with remarkable increase in immunostaining and the number of immunoreactive cells to calcium-regulating protein S100B. Furthermore, the brains infected with this virus reactivate the expression of vimentin, a neurodevelopment marker. This effect was more evident in the cerebral cortex and the hippocampus. On the other hand, no viral particles or ultrastructural changes were found inside the astrocytes. These results suggest that astrocytes are involved in the pathogenesis of rabies.

Keywords: Rabies, cerebral cortex, astrocytes, GFAP, vimentin, S100B.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1 La infección por el virus de la rabia.....	5
1.1.1 Historia natural y epidemiología	5
1.1.2 Características del virus de la rabia.....	6
1.1.3 Patogénesis de la rabia.....	8
1.2 Estructura de la corteza cerebral y el hipocampo.....	9
1.2.1 Estructura básica	9
1.2.2 Arquicorteza.....	10
1.2.3 Paleocorteza	11
1.2.4 Neocorteza.....	11
1.3 Los astrocitos y sus marcadores.....	13
1.3.1 Características generales de las células gliales	13
1.3.2 Importancia de los astrocitos en el Sistema Nervioso Central	15
1.3.3 Estructura y función de marcadores de astrocitos	18
1.3.3.1 Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP)	18
1.4 Respuesta de los astrocitos a la infección con el virus de la rabia: estado actual.....	24
2. Objetivos	27
2.1 Objetivo general.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. Materiales y métodos	29
3.1 Manejo de animales de laboratorio y obtención del virus rábico	29
3.2 Inoculación de los animales con el virus de la rabia y extracción de los cerebros.....	30
3.3 Descripción del área de estudio.....	31
3.4 Procesamiento de muestras para obtención de cortes en parafina	32
3.5 Inmunohistoquímica para marcadores de astrocitos	32
3.6 Morfometría de células inmunorreactivas.....	33

XII Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural del efecto de la infección con virus de la rabia sobre los astrocitos de la corteza cerebral en ratones

3.7	Conteos celulares y análisis densitométrico	35
3.8	Análisis estadístico	36
3.9	Microscopía electrónica	36
3.9.1	Microscopía electrónica convencional.....	36
3.9.2	Inmunomicroscopía electrónica	37
4.	Resultados	39
4.1	Descripción neurohistológica básica.....	39
4.2	Inmunorreactividad a GFAP en astrocitos de ratones inoculados por vía intramuscular	41
4.3	Inmunorreactividad a GFAP en astrocitos de ratones inoculados por vía intracerebral.....	48
4.4	Inmunorreactividad a GFAP en astrocitos de animales doblemente inoculados.....	52
4.5	Distribución de astrocitos inmunorreactivos a S100B. Inoculación intramuscular.	57
4.6	Inmunorreactividad de vimentina en la corteza y el hipocampo. Inoculación intramuscular.	61
4.7	Estudio ultraestructural convencional	64
4.8	Inmunomicroscopía electrónica	67
5.	Discusión.....	71
5.1	Breve análisis	71
5.2	Inmunorreactividad de astrocitos a GFAP	72
5.3	Inmunorreactividad de astrocitos a S100B	78
5.4	Inmunorreactividad de astrocitos a Vimentina	83
5.5	Ultraestructura de astrocitos en tejido infectado	86
6.	Conclusiones y recomendaciones	89
6.1	Conclusiones.....	89
6.2	Recomendaciones.....	89
A.	Anexo: Coloración de hematoxilina-eosina	90
B.	Anexo: Inmunohistoquímica para marcadores astrogliales	91
C.	Anexo: Inmunomicroscopía electrónica con GFAP	93
	Referencias	97

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Esquema de la estructura de la corteza cerebral y del hipocampo	13
Figura 1-2: Esquema que ilustra los detalles de la técnica morfométrica.	18
Figura 3-1: Imágenes de las áreas de estudio en plano coronal del cerebro de ratón.....	32
Figura 3-2: Esquema que ilustra los detalles de la técnica morfométrica.	35
Figura 4-1: Tinción H&E e inmunohistoquímica de rabia en la corteza cerebral de ratón.....	40
Figura 4-2: Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes en parafina (inoculación intramuscular).....	43
Figura 4-3: Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes de vibrátomo (inoculación intramuscular).....	44
Figura 4-4: Comparación del área y volumen del soma de las células positivas para GFAP (inoculación intramuscular).....	46
Figura 4-5: Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes de vibrátomo (inoculación intracerebral).....	49
Figura 4-6: Comparación del área y volumen del soma de las células positivas para GFAP (inoculación intracerebral).....	51
Figura 4-7: Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes de vibrátomo de ratones controles y ratones con rabia (doble inoculación intramuscular-intracerebral).....	53
Figura 4-8: Comparación del área y volumen del soma de las células positivas para GFAP (vía intramuscular-intracerebral).....	55
Figura 4-9: Células astrogliales marcadas con la proteína S100B en la corteza cerebral de ratón (inoculación intramuscular).....	58
Figura 4-10: Comparación del área y el volumen del soma de las células positivas para S100B (inoculación intramuscular).....	60
Figura 4-11: Inmunorreactividad a vimentina en la corteza cerebral e hipocampo de ratón (inoculación intramuscular).....	62
Figura 4-12: Ultraestructura de un astrocito de la corteza cerebral de ratón.	65
Figura 4-13: Ultraestructura de un astrocito de la corteza cerebral de ratón.....	65
Figura 4-14: Ultraestructura de un astrocito fibroso de la médula espinal de ratón... .	66
Figura 4-15: Ultraestructura de neuronas infectadas con virus de la rabia.....	67

Figura 4-16: Ultraestructura de un oligodendrocito en la corteza cerebral de ratón.....	67
Figura 4-17: Cortes semifinos de corteza cerebral coloreados con azul de toluidina.....	68
Figura 4-18: Ultraestructura de astrocitos inmunorreactivos a GFAP en corteza de ratón.....	69
Figura 4-19: Micrografía electrónica de pies de astrocitos marcados con GFAP.....	69
Figura 4-20: Inmunomicroscopía electrónica de neuronas inmunorreactivas a rabia en corteza cerebral de ratón.	70

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1: Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora anterior (inoculación intramuscular).....	45
Tabla 4-2: Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora posterior (inoculación intramuscular).....	45
Tabla 4-3: Densitometría óptica en células GFAP+ de la corteza motora anterior de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular).....	46
Tabla 4-4: Densitometría óptica de células GFAP+ en la corteza motora posterior de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular).....	47
Tabla 4-5: Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora anterior (inoculación intracerebral).	50
Tabla 4-6: Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora posterior (inoculación intracerebral).	50
Tabla 4-7: Densitometría óptica de la GFAP+ de la corteza cerebral de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intracerebral).	51
Tabla 4-8: Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora anterior (inoculación intramuscular-intracerebral).....	54
Tabla 4-9: Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora posterior (inoculación intramuscular-intracerebral).....	55
Tabla 4-10: Densitometría óptica de la GFAP+ de la corteza cerebral de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular-intracerebral).....	56
Tabla 4-11: Datos de los conteos de células S100B+ en la corteza motora anterior (inoculación intramuscular).....	58
Tabla 4-12: Datos de los conteos de células S100B+ en la corteza motora posterior (inoculación intramuscular).....	59
Tabla 4-13: Densitometría óptica de la S100B+ de la corteza cerebral anterior de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular).	60
Tabla 4-14: Densitometría óptica de vimentina en la corteza motora y el hipocampo de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular).....	63

Introducción

El virus de la rabia es neurotrópico y es considerado un problema de salud pública. Su letalidad afecta a un gran número de países en vía de desarrollo; la población más afectada y vulnerable son los habitantes de las zonas rurales (1). El virus tiene la facultad de infectar selectivamente al Sistema Nervioso Central (SNC) y se ha demostrado que ingresa por transporte axonal retrógrado. Se caracteriza por provocar pocos cambios morfológicos en el tejido y nervioso, por esta razón, algunos autores sugieren que los signos clínicos se deben más a eventos relacionados con cambios bioquímicos (2-5).

Si bien la rabia es una enfermedad que se puede prevenir mediante vacunación, ésta no se aplica masivamente a la población debido, principalmente, a su alto costo (4). La infección con el virus de la rabia es mortal cuando éste ha ingresado al sistema nervioso. Estudios clínicos y experimentos *in vitro* sugieren que durante una infección con rabia las funciones neuronales se mantienen estables hasta que el virus se disemina por todo el SNC (5), por lo tanto, es necesario desarrollar alternativas terapéuticas para bloquear oportunamente la acción del patógeno. Para esto se requiere profundizar en la investigación de la patogénesis de la infección (6,7). El protocolo de Milwaukee (3) promocionado desde hace más de una década como terapia para curar la enfermedad no ha sido exitoso (6). Hace unos años Kristensson *et al* (8) afirmaron que la falta de conocimiento sobre la patogénesis de la rabia se debía en parte a que no constituye un problema de salud pública en los países desarrollados y a la falta de integración entre virólogos y neurocientíficos; esta apreciación conserva plenamente su vigencia y hasta se considera a la rabia como una enfermedad olvidada (4,9).

Aunque la rabia ha sido una enfermedad muy estudiada en el campo epidemiológico, aún no se conocen muchos aspectos de su patogénesis. La rabia se caracteriza por presentar una gran paradoja, mientras que sus signos clínicos son dramáticos los efectos histopatológicos apenas revelan cambios sutiles. Hasta ahora, la investigación sobre la patogénesis de la rabia se ha enfocado principalmente a la población neuronal quizás

debido a que las partículas virales y los cuerpos de Negri (derivados de la reproducción del virus) se observan sólo en el pericarion de algunos tipos de neuronas (2,8,9). Sin embargo, las descripciones histopatológicas poco hacen referencia al efecto de la rabia sobre los astrocitos, las células gliales más abundantes del sistema nervioso.

Algunas de las funciones que cumplen los astrocitos en el SNC se relacionan con la homeostasis neuronal y cumplen el importante rol de proporcionar soporte físico a las neuronas, además de regular la transmisión de impulsos eléctricos. Estas células gliales también actúan como intermediarios entre las neuronas y los vasos sanguíneos, cumplen una función de filtrado, de modo que constituyen una parte de la barrera hematoencefálica (BHE), en conjunto con las células endoteliales. La conexión de los astrocitos con el sistema vascular permite que obtengan nutrientes de la sangre como la glucosa o el ácido láctico y puedan proporcionárselos a las neuronas. Los astrocitos también pueden recoger productos de desecho de las neuronas y transportarlos a la sangre para que puedan ser eliminados (10). Cuando se produce una lesión en el sistema nervioso los astrocitos se desplazan hacia ésta para fagocitar o eliminar las neuronas muertas, formando cicatrices en el área dañada al acumularse dentro de esta. Los astrocitos poseen gliofilamentos que contienen la proteína acida fibrilar de la glía (GFAP). Otra proteína fibrilar, la vimentina, también está presente, especialmente en etapa embrionaria (10,11).

Después de una lesión los astrocitos reactivos incrementan la expresión de GFAP, vimentina y S100B (una proteína de unión a calcio). Además se altera su morfología causando hipertrofia de sus procesos celulares formando la cicatriz glial alrededor de la zona afectada y aislando el tejido nervioso dañado del tejido sano. A la astrogliá también se le ha encontrado la función de almacenar glucógeno y mantener el equilibrio iónico en el espacio extracelular; en particular, al revertir la acumulación excesiva de potasio porque son muy permeables a estas moléculas (10,11).

Las publicaciones sobre microscopía electrónica, las descripciones histopatológicas convencionales y los escasos estudios inmunohistoquímicos de rabia con GFAP, poco o nada hacen referencia al efecto de la infección sobre los astrocitos y su papel en la patogénesis de la enfermedad (2,5,7,12,13). Aunque los astrocitos están implicados en la homeostasis neuronal, no se conoce el papel de las células gliales en la patogénesis de la rabia en el contexto de la interacción estructural y funcional entre astrocitos y neuronas.

Por otra parte, trabajos previos han revelado el efecto de la infección con virus de la rabia sobre la inmunorreactividad de glutamato y GABA en la corteza cerebral de ratones (14,15,16) y los astrocitos son protagonistas en el metabolismo de estos dos neurotransmisores (17,18). Por estas razones y en general por la importancia funcional de la interacción entre astrocitos y neuronas, es necesario estudiar los efectos de esta infección sobre la astrogliá.

El propósito de este trabajo fue estudiar la citomorfología y ultraestructura de los astrocitos, además de la reacción de tres de las moléculas que las identifican, en la corteza cerebral de ratones infectados con el virus de la rabia por dos vías de inoculación, intramuscular e intracerebral. En particular, determinar si el virus de la rabia altera la inmunorreactividad de las proteínas, GFAP, S100B y vimentina implicadas en la regulación del funcionamiento de los astrocitos y si el virus puede de alguna manera infectar a estas células. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan evidencia experimental fundamental para aproximarse a la comprensión de la patogénesis de la rabia.

1.Marco teórico

1.1 La infección por el virus de la rabia

1.1.1 Historia natural y epidemiología

La rabia es una zoonosis de etiología viral, caracterizada por ser una infección aguda del sistema nervioso transmitida de un animal a otro por mordedura y es irreversiblemente letal. Todos los animales de sangre caliente pueden adquirir la enfermedad, pero su susceptibilidad varía según la especie, la edad, la localización de la mordedura y las características de la cepa viral (5,7). La rabia está presente en todos los continentes (excepto la Antártida), en más de 106 países. Se estima que 59.000 personas mueren en el año por rabia y la mayoría de estas muertes (más del 95%) se registran en África y Asia. Aunque la rabia es 100% prevenible por medio del tratamiento oportuno se siguen presentando muertes en muchos países (1). La rabia se clasifica en urbana y silvestre. En la urbana, que a pesar de su nombre incluye casos rurales, los perros son el transmisor principal. En Latinoamérica el perro es el principal vector para el hombre, seguido por los murciélagos hematófagos (conocidos como vampiros), el gato y el zorro. La rabia canina constituye una amenaza potencial para más de 3.300 millones de personas en Asia y África; el mayor riesgo lo corren quienes viven en zonas rurales donde no hay disponibilidad o facilidad de acceso a las vacunas e inmunoglobulinas humanas (1,19,20). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció como objetivo eliminar las muertes por rabia como problema de salud pública a través de la vacunación canina para el año 2030 (1).

La rabia es conocida desde hace cerca de 4.000 años, pero es solo en 1880, cuando Pasteur comenzó sus investigaciones, e inició la que suele aceptarse como la era científica de la rabia. Entre los años 1870 y 1900 por primera vez se hicieron descripciones

histológicas de la rabia en el SNC de las cuales se mostraron depósitos de células inflamatorias y polimorfonucleares rodeando los vasos sanguíneos del SNC. Además Babes reportó unos agregados alrededor de las neuronas en proceso de degeneración de la cromatina llamados nódulos de Babes (21,22). En 1903, Negri descubrió las inclusiones que llevan su nombre (cuerpos de Negri), y que son el rasgo patognomónico de la infección (8). Más adelante, la inclusión eosinofílica del cuerpo de Negri por microscopía electrónica se observó igual a la matriz ubicada en el sitio de replicación del virus. Desde 1963, con la aplicación de las técnicas de microscopía electrónica, el cultivo de células y los nuevos métodos inmunológicos, se han hecho grandes avances en el conocimiento de esta enfermedad y de su prevención. En las Américas, los primeros datos sobre la aparición de la rabia se remontan al siglo XVIII cuando se descubrieron los primeros casos en perros y zorros (22).

En Colombia se registraron 1088 casos de rabia urbana entre 1992 y 2002, de los cuales 42 fueron en humanos y 1046 en perros (23). En la comunidad Embera de Bajo Baudó (departamento del Chocó) se reportó un brote de rabia humana causado por murciélagos hematófagos (24). La más reciente epidemia de rabia humana en Colombia originada por caninos ocurrió entre 2006 y 2007 en el distrito de Santa Marta (25). Posteriores casos esporádicos de rabia humana se han originado en murciélagos pero transmitidos por gatos, los dos más recientes en 2012 en Roldanillo (Valle del Cauca) (26) y en una joven de 25 años en Bogotá mordida por una gata proveniente de la región del Tequendama, Cundinamarca en el 2017 (27).

1.1.2 Características del virus de la rabia

El virus causante de la rabia pertenece al género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae* constituida por cerca de 20 virus de morfología muy parecida pero con diferentes propiedades que infectan a mamíferos, peces, insectos y plantas. El virus rábico clásico tiene forma de bastoncillo o de bala con una extremidad redonda y otra plana; el diámetro de la partícula es de 75-80 nm y la longitud media de 180 nm (2,28). Los rabdovirus poseen una molécula de ARN negativo de una sola hebra, con una longitud aproximada de 12.000 nucleótidos. El genoma del virus rábico codifica para las cinco proteínas estructurales que lo conforman: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la

glicoproteína de superficie (G) y la polimerasa viral (L). El virus está rodeado por una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped obtenida durante su liberación. En ésta bicapa está inmersa la glicoproteína de superficie (proteína G, que es integral de membrana), la cual se considera como responsable del anclaje a las células y, también, la mayor responsable de la inducción de la respuesta inmune en el huésped. La proteína G se organiza en forma de homotrímeros y tiene gran importancia en el momento de reconocer el receptor en la célula por infectar y en el proceso de fusión de membrana durante el desnudamiento (28).

La entrada del virus de la rabia en las células del sistema nervioso ocurre no a través de una sola molécula, sino usando un conjunto de moléculas, simultáneamente o secuencialmente llamadas correceptores, uno de los cuales une al virus y, luego, le induce cambios a éste o a las moléculas vecinas en la célula para producir un verdadero receptor que promueve la infección. El virus puede requerir en la periferia receptores de alta afinidad o altamente concentrados para ser capturado por las terminaciones nerviosas o en la placa neuromuscular y luego, después de ser transportado hasta el sistema nervioso central, usar moléculas dispuestas más ubicuamente para su proceso de dispersión y saltos transinápticos. No está claro si los receptores proteicos hasta hoy caracterizados (receptor nicotínico de la acetil colina, RNACH, las moléculas de adhesión celular, NCAM y el receptor p75^{NTR}), requieren estar juntos en el sitio de la captura o, si por su distribución particular, constituyen vías de entrada diferentes (28).

Desde el punto de vista de su origen y comportamiento en el huésped, se reconocen dos tipos de virus rábico. El virus 'calle' que tiene un período de incubación muy variable, se multiplica en las glándulas salivales y se elimina por la saliva y el virus 'fijo' que se obtiene haciendo pases seriados por vía intracerebral en los animales, hasta lograr un tiempo de incubación constante de 5 a 6 días y es el utilizado para la producción de vacunas inactivadas. En otras palabras, el virus 'calle' es el virus silvestre que circula en la naturaleza y el virus 'fijo' es un virus adaptado y modificado en laboratorio. Estos dos tipos de virus recibieron esos nombres en el laboratorio de Pasteur (22). El virus rábico se comporta como un antígeno potente y aun inactivado induce la producción de anticuerpos con una sola dosis, suficiente para proteger los animales por un año o más contra varias dosis letales del virus. Después de su adaptación el virus es cultivable en embrión de pollo y en líneas celulares primarias o continuas y, en general, no produce efecto citopatogénico

in vitro, pero en las células infectadas se presentan inclusiones llamadas matrices, semejantes a los cuerpos de Negri (28).

1.1.3 Patogénesis de la rabia

Aunque la rabia ha sido una enfermedad conocida hace siglos y muy estudiada en el campo epidemiológico, aún no se conocen muchos aspectos de su patogénesis, especialmente en el sistema nervioso central (SNC). El cuadro histopatológico de la rabia es sorprendente, dado que la imagen microscópica del cerebro de pacientes que padecen de ésta entidad, tan rápidamente fatal, se limita como máximo a unos pocos infiltrados celulares perivasculares y algunas inclusiones eosinófilas intracitoplasmáticas, los cuerpos de Negri, más frecuentes en las neuronas piramidales de la corteza cerebral y el hipocampo y en las células de Purkinje del cerebelo (2,8,29).

El cuadro clínico que se presenta en el hombre sugiere que la muerte del paciente con rabia puede originarse por disautonomía, la cual obedece a un bien comprobado ataque del virus a las neuronas de los ganglios simpáticos. El período de incubación varía entre diez días y tres meses aunque algunos aceptan períodos más largos, pero, el más frecuente no excede tres semanas; su duración está relacionada directamente con la proximidad del sitio de mordedura al SNC. En un 80% de los casos, el primer síntoma es el dolor en el sitio de la mordedura. En la fase aguda hay un estado de ansiedad, obnubilación y desorientación seguido por agitación, dificultad para la deglución, aceleración del pulso, reflejos exagerados o disminuidos, insomnio, a veces alucinaciones, delirio y convulsiones; menos frecuentes son la sialorrea, la cefalea y, más rara aún (25% o menos), alguna tendencia a morder. La hidrofobia y la aerofobia ocasionadas por la agresión viral al núcleo del nervio glosofaríngeo (lesión de Cajal) se presentan en la mitad de los pacientes, se manifiesta como un espasmo a veces muy dramático (29,30).

La forma paralítica se manifiesta por una mielitis ascendente aguda y hay formas muy raras con carácter de polineuritis. La enfermedad clínica en el hombre tiene una duración de cinco a doce días, excepcionalmente 3 a 4 semanas. No son raros los casos en los cuales el enfermo se conserva lúcido hasta el final; excepcionalmente, entra en estado de coma desde el primero o segundo día de la enfermedad. La muerte puede sobrevenir

súbitamente o antecedida por un paro respiratorio (29,30). En ratones puede presentar signos clínicos como disminución en el movimiento, piloerección, emaciación, encorvamiento, agitación, acalamamiento excesivo, y espasmos en patas traseras. En el día 4 pueden presentar temblor, hipokinesia, espasticidad en las patas traseras (5)

1.2 Estructura de la corteza cerebral y el hipocampo

1.2.1 Estructura básica

En el cerebro de los mamíferos la estructura de la corteza cerebral conserva un patrón básico uniforme y los tipos celulares característicos que la conforman son esencialmente los mismos en aquellos animales que han sido más estudiados: ratón, rata, gato y primates (incluyendo al hombre) (31). La similitud estructural es tal que el número absoluto de neuronas (10^{10} neuronas aproximadamente) contado en columnas corticales de la misma anchura es constante en los animales antes mencionados (32). Utilizando la técnica de Golgi, Ramón y Cajal realizó la descripción de la organización, estructura y conexiones de las neuronas de la corteza cerebral en el hombre y vertebrados (31). Las descripciones generales de la estructura, así como de la neuroquímica y la función neuronal en la corteza cerebral, son el resultado de las investigaciones realizadas principalmente en roedores, carnívoros y primates (31).

La corteza cerebral está constituida por una lámina de sustancia gris. Envuelve todo el telencéfalo y contiene células nerviosas (neuronas piramidales de axón largo e interneuronas de axón corto), células neurogliales, vasos y fibras nerviosas. Las neuronas están acompañadas por una mayor proporción de células gliales (31). En humanos la corteza cerebral tiene un área superficial que mide aproximadamente 2600 cm^2 y grosor que oscila entre 1.5 mm del área visual del lóbulo occipital y 4 mm del área motora primaria del lóbulo frontal. La mayoría de los cuerpos neuronales miden entre 10 y 50 μm de diámetro. Las neuronas piramidales conforman el 70% de las neuronas en la corteza, además, emplean como principal neurotransmisor el aminoácido glutamato y en menor proporción el aspartato. Se diferencia notablemente de otro tipo de células por su dendrita apical que puede ir desde la capa V a la capa I. En las espinas dendríticas se establecen numerosos contactos sinápticos. Además otra característica de estas células es que sus axones se proyectan fuera de la corteza cerebral. Las interneuronas abarcan el 30% de

piramidales modificadas), y se extiende desde el septum (dorso-rostral) al lóbulo temporal (ventro-caudal) del encéfalo (38) y tiene como función fundamental construir, establecer y representar los recuerdos espaciales (36). Su citoarquitectura se forma por la generación continua de miles de neuronas que realizan el cambio cortical del hipocampo, mediante un proceso de multiplicación de precursores neuronales de la zona subgranular, que luego reemplazarán a las células piramidales. Estos precursores celulares (células progenitoras neurales) también pueden dar origen a astrocitos y oligodendrocitos (64). La estimulación sensorial interna o externa puede estar relacionada con mayor tasa de neurogénesis en esta área (36). Gran número de las nuevas neuronas se diferencian en células granulares que se incorporan en los circuitos del hipocampo. Las conexiones sinápticas de la región CA1 son las responsables de codificar la información espacial en el hipocampo, en conjunto con las fibras eferentes (fibras musgosas) del giro dentado que también se comunican formando conexiones sinápticas con las neuronas de las regiones CA2 y CA3 (Figura 1-1) (38)

1.2.3 Paleocorteza

La paleocorteza evolutivamente corresponde a un área intermedia entre la más antigua arquicorteza y la más reciente neocorteza. La paleocorteza equivale a corteza olfatoria o rinencéfalo. Inicialmente se pensaba que incluía más partes del prosencéfalo de las que actualmente se considera que están dedicadas al sentido del olfato (38,39). Actualmente la corteza olfatoria se restringe a las regiones que reciben fibras aferentes de los bulbos olfatorios. La paleocorteza o corteza olfativa se encuentra en la mayoría de los mamíferos localizada en el uncus, el giro parahipocampal, el área entorrinal adyacente y comprende también una parte de la amígdala y de la ínsula (38,39).

1.2.4 Neocorteza

La neocorteza o isocorteza es la corteza filogenéticamente más desarrollada. En el cerebro de los mamíferos la estructura de la corteza cerebral conserva un patrón básico uniforme y los tipos celulares característicos que la conforman son esencialmente los mismos en aquellos animales que han sido más estudiados: ratón, rata, gato y primates (31,32). Maynert y Betz a mediados del siglo XIX determinaron la organización celular de las capas corticales y poco tiempo después, Bevan Lewis propuso la división de las seis capas

celulares que se encuentran organizadas de forma horizontal donde hay diversidad morfológica (33). Las capas corticales se numeran desde la superficie hasta la profundidad (I-VI). La capa I se encuentra más superficial, también llamada capa molecular, posee un escaso número de células; además, las ramas terminales (dendritas) de las neuronas piramidales concluyen en esta capa. En la capa II o capa granular externa se encuentran las células piramidales más pequeñas de proyección ipsilateral. Las células piramidales medianas pertenecen a la capa III, sus axones, todos de proyección contralateral conforman el cuerpo calloso. Las capas II y III alojan células piramidales de tamaños variables. En la capa IV o capa granular interna se encuentran las células estrelladas espinosas. Las células de las capas II y IV tiene apariencia similar. Las neuronas piramidales grandes y medianas pertenecen a la capa V y sus axones se pueden proyectar a grandes distancias (tallo cerebral o la médula espinal) mientras que sus dendritas suben en dirección a la capa molecular. En la capa VI se encuentran células polimorfas o fusiformes. Mezcladas con las piramidales en todas las capas se disponen las interneuronas, principalmente: células en cesta, células en candelabro, células bipolares, células neurogliaformes, células biperachadas y células de Martinotti; estas últimas proyectan su axón hasta la capa I. (Figura 1-1) (31,33,34). Cada capa opera de forma individual e integral gracias a sus conexiones lo que permite comunicación entre las capas corticales (33,34).

Figura 1-1: Esquemas de la estructura de la corteza cerebral y del hipocampo.

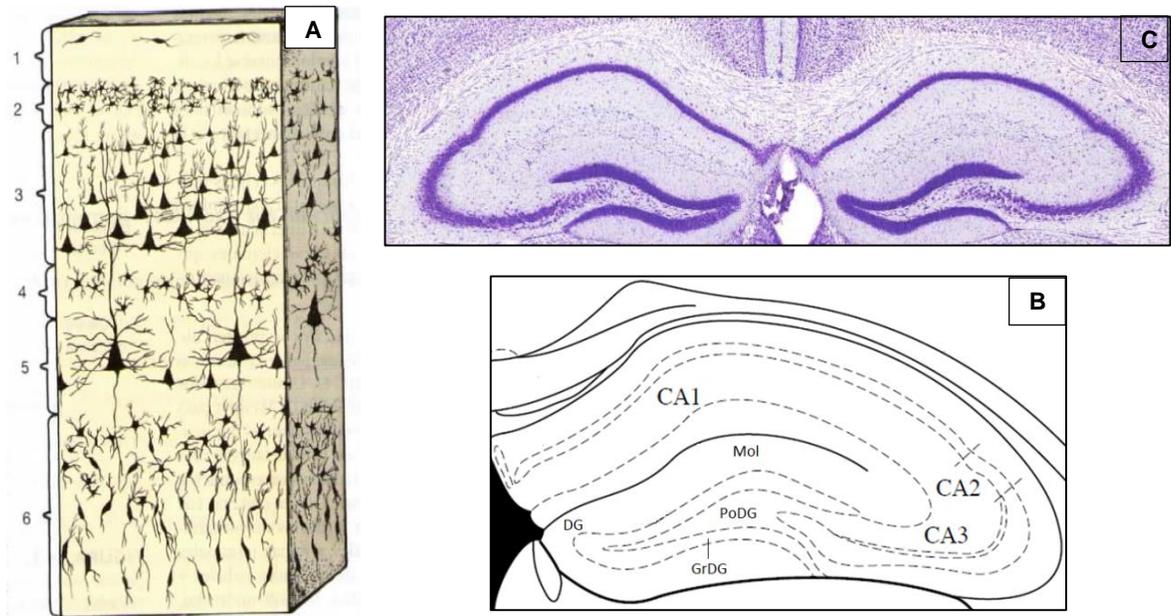


Figura 1. **A.** Estructura de la neocorteza cerebral en columna vertical. Se observan los cuerpos neuronales característicos de cada capa cortical con el método de Golgi (Tomado de ref. 38). **B.** Esquema del hipocampo de ratón indicando sus áreas principales. **C.** Hipocampo de ratón a lado y lado de los hemisferios cerebrales. Las bandas densamente marcadas corresponden a la capa de neuronas piramidales (CA1-CA3) y la capa de células granulares (GrDG). Tinción Hematoxilina-Eosina (B y C tomados de ref. 119). DG, giro dentado; Mol, capa molecular; PoDG, capa polimórfica;

1.3 Los astrocitos y sus marcadores.

1.3.1 Características generales de las células gliales

Las células gliales se distinguen de las neuronas por su tamaño, morfología, localización propiedades bioquímicas y electrofisiológicas. Cumplen un papel importante en la neuromodulación y mantenimiento de las neuronas ayudando en la comunicación interneuronal. Este tipo de células nerviosas constituyen aproximadamente el 50% de volumen del parénquima nervioso cerebral y son más numerosas que las neuronas; solamente los astrocitos se calcula que están en una proporción de 10:1 en comparación con las neuronas (40,41). El concepto de neuroglia fue propuesto inicialmente por Rudolf Virchow, donde sus dibujos iniciales parecen microglia activada más que a los astrocitos y los oligodendrocitos. Ramón y Cajal en 1913 llevó a cabo las primeras descripciones de células gliales con el método de impregnación en cromato de plata y oro sublimado. Las

primeras células gliales descritas fueron los astrocitos, como células numerosas y relativamente grandes (42). Pío del Río Hortega, en 1921, con la técnica de carbonato de plata, identificó otro grupo de células gliales de origen mesodérmico denominadas microglia. Más adelante se identificaron células de cortas proyecciones citoplasmáticas y formadoras de vaina de mielina llamadas oligodendrocitos. Los tres tipos de células gliales pueden variar según su ubicación en el individuo, especie y también con la edad (17,38,43,44).

Hasta la década de los años 80 la glía recibió poca atención debido a que se consideraban sólo como células de soporte (41,43) y toda la atención estaba enfocada al estudio de la fisiología neuronal. De hecho el término 'glía' procede del griego 'glue' que significa pegante y refleja la creencia en el siglo XIX de que estas células mantenían unido al tejido nervioso. La palabra 'glía' ha sobrevivido a pesar de la falta de evidencia de que una de sus funciones sea la de mantener compacto el tejido nervioso. Entre las funciones bien establecidas están el mantenimiento del medio iónico, la modulación de la actividad sináptica y la propagación de las señales nerviosas, en algunas fases del neurodesarrollo y en la recuperación luego del daño neuronal (41,43). Los astrocitos, que son células restringidas al sistema nervioso central (SNC), poseen procesos celulares que le dan una apariencia estrellada. Los oligodendrocitos tienen como su principal función formar la mielina en el sistema nervioso central, donde esta misma función la cumplen las células de Schwann en los nervios periféricos. Por último, la microglía tiene el mismo origen y funciones de los macrófagos de otros tejidos (38). Todas estas células, excepto la microglia, se generan durante el desarrollo a partir de la célula madre neural (NSC) (45).

Con los avances metodológicos se pudo observar y analizar con mayor atención la estructura y funciones de las células gliales considerando de ese modo la importancia que tienen en su estado normal y patológico (17,42). La tradicional clasificación morfológica de las células en el SNC de mamíferos (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglia y células endimarias) probablemente esté muy simplificada. La presencia de proteínas específicas en cada tipo de célula (marcadores) ha dado lugar a la producción de anticuerpos que permiten la localización *in situ* de los diferentes tipos de células y a ampliar los conocimientos sobre sus características en condiciones normales y patológicas (44). Un ejemplo de esto fue el descubrimiento de las células NG2 que morfológicamente

podrían interpretarse como astrocitos pero que poseen propiedades bioquímicas y fisiológicas que difieren de aquellos (46). Aunque se hace mención de la glía que se encuentra en el SNC, este trabajo está enfocado solamente en los astrocitos.

1.3.2 Importancia de los astrocitos en el Sistema Nervioso

Central

Los astrocitos se encuentran dentro de las células gliales más abundantes del encéfalo, conformando aproximadamente el 50% de las células del neocórtex y en una proporción 10:1 superando a las neuronas en el cerebro humano (40,41). Durante el desarrollo la glía radial, además de originar los precursores de astrocitos, posibilita la migración de manera organizada de estas células y ellas mismas al SNC. Constituyen la glía *limitans* bordeando el SNC y otros tejidos (47). Los astrocitos tienen un diámetro del soma promedio de 10 μm , su forma es estrellada y poseen retículo endoplasmático, aparato de Golgi y lisosomas. Del cuerpo central o soma salen diferentes prolongaciones que finalizan en estructuras llamadas pies terminales y están constituidos por gliofilamentos. Los gliofilamentos están compuestos por polímeros de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), reportada como el marcador más utilizado para astrocitos (44,62). Además se encuentra otra proteína esencial para el ensamblaje de la GFAP llamada vimentina, importante cuando las dos proteínas están presentes en la misma región cerebral (49,79). También se han descrito otros marcadores para astrogliá como la proteína S100B y la enzima glutamina sintetasa (11).

En los astrocitos se pueden observar dos tipos de procesos: los procesos perisinápticos que envuelven la sinapsis y los procesos vasculares que son mucho más largos y rodean los vasos sanguíneos (48). En roedores se ha observado que un astrocito desarrolla ramificaciones selectivas a lo largo de la materia gris haciendo contacto con varios cientos de dendritas y decenas de miles de sinapsis, aproximadamente 300-600 procesos neuronales (50). Los astrocitos se interconectan entre ellos por medio de las uniones gap (gap junctions) modulados por niveles de calcio, neurotransmisores, potencial de membrana y demás. Estas uniones gap permiten la redistribución de iones y metabolitos, además facilitan el desplazamiento del glutamato por la barrera Hematoencefálica (BHE) (51).

Por otra parte, en el microscopio electrónico los astrocitos se distinguen de las neuronas por su menor tamaño, cromatina condensada, citoplasma claro y núcleo más oscuro. Los núcleos de los astrocitos fibrosos presentan forma arriñonada o irregular con invaginaciones profundas. El rasgo ultraestructural más prominente en el citoplasma de estos astrocitos son las numerosas fibrillas o filamentos constituidos principalmente la proteína GFAP que se extienden en paralelo hacia los procesos celulares. En los astrocitos protoplasmáticos son escasos estos filamentos y los núcleos son más redondeados y con pocas invaginaciones (43).

Existen dos grandes formas astrocíticas: los astrocitos protoplasmáticos y los fibrosos que difieren de su morfología, localización, genotipo antigénico y su historia del desarrollo dentro del SNC (17,52). Los astrocitos fibrosos se encuentran en su gran mayoría en la sustancia blanca, tienen prolongaciones citoplasmáticas cilíndricas, lisas y largas con gruesos fascículos de filamento de proteína GFAP que a veces cubren los vasos sanguíneos y se caracterizan por contactar los nódulos de Ranvier. Los astrocitos protoplasmáticos se sitúan generalmente en la sustancia gris, tienen más ramificaciones con prolongaciones rugosas, cortas y planas que forman capas delgadas que envuelven las ramas terminales de los axones, las dendritas y las sinapsis (43,52).

No obstante, se pueden encontrar gran diversidad de fenotipos y subtipos astrocíticos que se definen por su heterogeneidad funcional y molecular de acuerdo a la expresión génica durante el desarrollo de progenitores gliogénicos, variedad de expresión de proteínas como las conexinas, nivel de calcio (Ca^{+2}), linaje, y su especialidad individual y regional en la materia gris y blanca tanto en el SNC sano como en el condiciones patológicas (53-55). Dentro de este grupo se encuentran variaciones morfológicas como las células de Müller en la retina, tanicitos en el tercer ventrículo, pituicitos en la neurohipófisis y la glía de Bergmann en el cerebelo entre otras (17). Los astrocitos protoplasmáticos dificultan su observación por la técnica de inmunohistoquímica con GFAP debido a que apenas contienen una baja concentración de esta proteína (52). No obstante, esto es lo que ocurre en condiciones normales del tejido nervioso; en condiciones patológicas los astrocitos protoplasmáticos pueden manifestar intensa reactividad fibrilar (17,43).

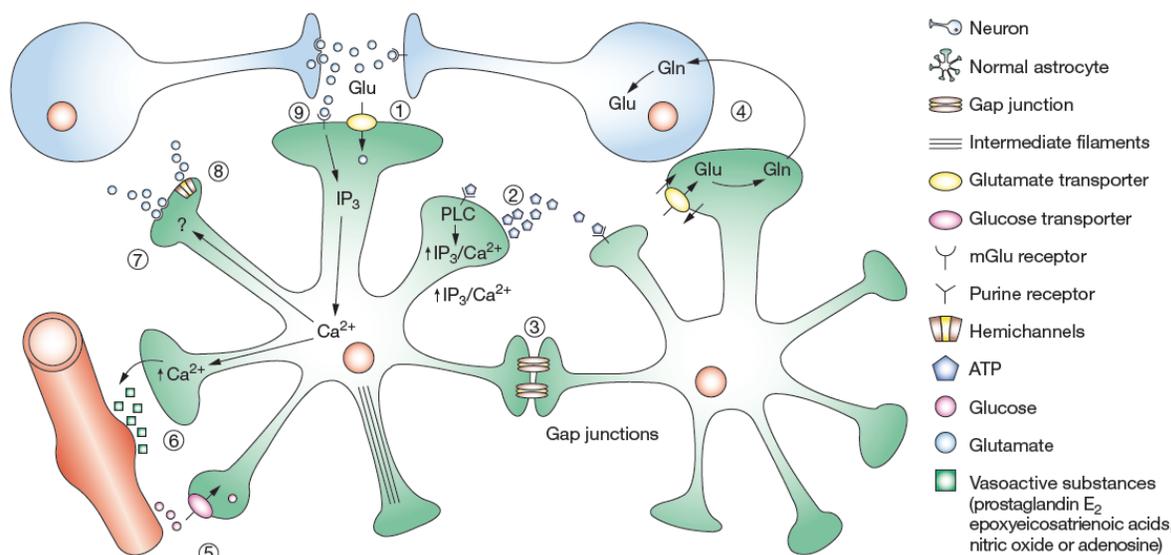
Aunque inicialmente se pensaba que las células astrogiales solo proporcionan soporte a las neuronas vecinas, meninges y vasos sanguíneos (43,56), ahora se conoce que cumplen diversas funciones homeostáticas y neuroprotectoras en el SNC (18). Algunas de estas se relacionan con el mantenimiento de la integridad de la BHE mediante asociación de los pies terminales y vasos sanguíneos (56). También pueden promover la sináptogenesis y regular la liberación de neurotransmisores (principalmente glutamato y ácido gamma-aminobutírico-GABA) por medio de la rápida eliminación en la hendidura sináptica permitiendo estabilizar la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal (Figura 1-2) (42,56). Pueden incluso liberar adenosin trifosfato (ATP), proveer antioxidantes (glutación, ascorbato y superóxido dismutasa) y nutrientes a las neuronas y mantener estable el pH extracelular eliminando el CO₂ que las neuronas producen (57). También mantienen la homeostasis neuronal del glutamato, iones y agua. Adicionalmente, acumulan la energía en forma de glucógeno y reparan tejidos (42).

Asimismo los astrocitos protegen al cerebro de la toxicidad por el daño oxidativo causado por los ácidos grasos insaturados, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), óxido nítrico (NO) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), metales y xenobióticos (56). Además provee de varios factores tróficos y citoquinas a las neuronas después de una lesión. Forman la “sinapsis tripartita” modulando la transmisión sináptica y la plasticidad por la liberación dependiente de Ca⁺² de algunos gliotransmisores como glutamato, ATP o D-serina (58). Por otro lado, los astrocitos desarrollan una serie de alteraciones morfológicas tales como hipertrofia de sus procesos celulares y funcionales, después de una lesión y son llamados astrocitos reactivos formando una cicatriz glial alrededor de la zona afectada y permitiendo de esta manera aislar el tejido nervioso dañado del tejido sano, para una mejor reparación brindando protección neuronal (48). Una característica bien conocida de los astrocitos reactivos son los cambios relacionados con la hipertrofia celular incrementando de esta manera la expresión de GFAP, vimentina y S100B (57).

Por otra parte, los astrocitos presentan diferentes respuestas a ciertas enfermedades del SNC que afectan al hombre como la enfermedad de Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y esclerosis múltiple (57,59). Las enfermedades como el Alzheimer y Niemann-Pick exhiben alteraciones en la regulación y síntesis del colesterol por parte de la glía (60). En la isquemia cerebral, en lesiones cerebrales o excitotóxicas causada principalmente por incremento del glutamato extracelular, además del daño al SNC

causado por algún trauma, infartos y trastornos desmielinizantes puede mostrar deterioro o muerte de neuronas y astrocitos o hipertrofia y proliferación selectiva de los astrocitos en el área afectada; esta reacción proliferativa está acompañada de procesos inflamatorios como la liberación de citoquinas y quimioquinas que inhiben la regeneración axonal (48,49,57,59).

Figura 1-2: Esquema de algunas relaciones funcionales del astrocito normal.



Una de las funciones más importantes de los astrocitos se relaciona con la sinapsis. Dentro de este proceso intervienen una serie de moléculas que modulan el ciclo glutamato-glutamina, el flujo sanguíneo y la activación y aumento del calcio intracelular. Figura tomada de Maragakis y Rothstein, 2006 (61).

1.3.3 Estructura y función de marcadores de astrocitos

1.3.3.1 Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP)

La GFAP fue descubierta en 1969 en placas desmielinizantes de pacientes con lesiones causadas por esclerosis múltiple (62). Esta proteína es una subunidad molecular que forma uno de los cinco tipos de filamentos intermedios (IFs), junto con vimentina, nestina y sinemina que se asemejan en la homología de la secuencia y la organización intrón-exón de los genes. Los filamentos de la GFAP pueden migrar desde el zona perinuclear, dando lugar a haces que convergen en los procesos celulares (63,65). En conjunto con los microtúbulos y microfilamentos, están involucrados en la estructura y función proteica

relacionada con la estabilidad del citoesqueleto y la comunicación celular, específicamente de las células astrocíticas maduras que se encuentran en mayor proporción en el cerebro de adulto (66). Entre otras de las actividades en que participa esta proteína se encuentran el mantenimiento de la arquitectura cerebral, el adecuado funcionamiento de la BHE, la migración de los astrocitos, en las interacciones entre la glía-neurona y en las vías de transducción de señales. La GFAP es el marcador que identifica a los astrocitos y es el soporte molecular de su morfología básica (18,65).

Los filamentos intermedios tienen un diámetro de 8-12 nm y se encuentran entre los filamentos de actina y los microtúbulos. Se clasifican en proteína de filamento intermedio tipo III en conjunto con la vimentina, desmina y periferina. Conforman tres dominios: amino terminal, región helicoidal central (310-350 residuos de aminoácidos) y extremo carboxi-terminal. Los filamentos intermedios de los astrocitos son modulados por modificaciones post-traduccionales tal como su estado de fosforilación/desfosforilación, glicosilación y citrulinación que también pueden influir en la estructura y en las propiedades funcionales de GFAP (señalización, formación de la red e interacciones con otras proteínas) (64,66,67).

Por caracterización computacional se han identificado ocho diferentes isoformas de GFAP, que se generan por *splicing* alternativo del RNA primario. Las diferentes isoformas son expresadas en subconjuntos específicos de astrocitos que pueden cambiar las propiedades de la red de microfilamentos de una célula. La expresión diferencial de las isoformas de GFAP durante el desarrollo del SNC y el envejecimiento, podrían indicar una función especializada de las isoformas para estas células, pero aún no se tiene pleno conocimiento (68).

Dentro de las isoformas de GFAP se encuentran las siguientes: la isoforma α , que se ha descrito como la más abundante y estudiada; la isoforma β está presente en ratas y no se ha encontrado en el SNC humano; la isoforma γ se puede encontrar en la medula ósea de ratón y bazo y es menos abundante en el SNC de humano y de ratón; la isoforma δ/ϵ es altamente homóloga debido a que da lugar a la misma proteína en rata ratón y humano; la κ es la isoforma más reciente; la isoforma $\Delta 135$ se ha encontrado en neuronas y astrocitos de hipocampo de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome de Down (SD) y epilepsia; la isoforma $\Delta 164$ es incapaz de auto-ensamblaje ya que carece por completo del dominio de cola (N-terminal) y parte del dominio central. La mayoría de las isoformas

se diferencian por el número de exones o exones alternativos y el número de aminoácidos (66,68).

Por otro parte, la inmunohistoquímica ha permitido identificar la GFAP a las 8 o 9 semanas de edad postnatal en el SNC humano donde se observa transformación de la glía radial a la astrogliosis en la médula espinal (69). La inmunorreactividad en el encéfalo también varía de acuerdo a la edad y localización (70). La GFAP en el SNC se localiza en astrocitos fibrosos en la sustancia blanca, astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris, en la glía de Bergmann (cerebelo) y en los astrocitos subependimales del ventrículo lateral (65). También se ha encontrado inmunorreactividad a la GFAP en otras células no astrocíticas, como las células de Schwann o células de Kupffer (65). La síntesis de GFAP se considera un evento significativo de desarrollo de la diferenciación de astrocitos y es parte de la respuesta reactiva a casi cualquier lesión del SNC. En condiciones normales la expresión de la GFAP se encuentra en niveles bajos. Su expresión aumenta cuando se presenta una lesión o un daño del SNC. La cooperación de GFAP y la vimentina son indispensables en la formación de cicatriz glial luego de alguna lesión en el encéfalo (64,65,70).

1.3.3.2. Proteína vimentina

La vimentina se ubica dentro del grupo de las cinco proteínas de filamento de tamaño intermedio del citoesqueleto, mide cerca de 7-11 nm, y su peso molecular es de 58.000 (71,72). Este dímero está estructurado de manera general como las demás proteínas de IFs que se caracterizan por tener sus dominios C-terminal y N-terminal. Es una proteína intracelular y extracelular sintetizada por los astrocitos que se relaciona con la migración celular, adhesión celular y crecimiento axonal (73,74). Hace parte de la integridad y estructura celular del citoplasma. La vimentina se entrecruza con la nestina, lo cual depende de sus concentraciones relativas. Este entramado es importante para el proceso de mitosis y la interacción y transporte de vesículas intracelulares (75).

La vimentina se expresa durante el desarrollo embrionario y la diferenciación. Se encuentra en gran diversidad celular como la glía radial y células ventriculares pero dentro del SNC. Está principalmente en las diferentes etapas del desarrollo de los astrocitos. Esta proteína se puede polimerizar ella misma o formar heterómeros con otras proteínas (76,77).

Dependiendo de la subpoblación de astrocitos, varían los niveles de expresión de la vimentina y otros IFs. La vimentina y la GFAP tienen aproximadamente el 80% de homología con la secuencia de la proteína primaria (74). En ratones knockout neonatos las células astrocíticas diferenciadas pasan por un periodo de transición donde la vimentina desaparece y se reemplaza por la GFAP, pasando por un punto donde se coexpresan las dos proteínas (49). Basset y colaboradores han observado por medio de la técnica de inmunofluorescencia, en astroglia normal y cultivo celular, que las proteínas GFAP y vimentina colocalizan en la misma red de filamentos intermedios (78).

Los gliofilamentos de vimentina se caracterizan por ser abundantes, hacen parte de la formación de la cicatriz glial, ayudan a la plasticidad estructural y mantenimiento de los astrocitos en desarrollo o progenitores y también de algunos astrocitos maduros; además por inmunohistoquímica se ha determinado que la vimentina es un marcador para astrocitos reactivos (74). Adicionalmente, la vimentina puede influir en la formación de los filamentos intermedios ya sea por co-polimerización con otros filamentos intermedios o de manera indirecta y está relacionada con la estabilización, formación y modulación de la expresión de la GFAP en algunos astrocitos reactivos (79). En ratones tipo silvestre la vimentina se ha encontrado también en el cuerpo caloso y el hipocampo (80). Los iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden interactuar con 11 aminoácidos del extremo C-terminal de la vimentina para favorecer la rigidez y arquitectura de los FI (81). Otras de las funciones de la vimentina están relacionadas con el metabolismo lipídico y la regulación de la localización, soporte, composición y orientación del mecanismo endosomal (82). Además, la red de filamentos de vimentina mantiene la organización de la cromatina y la morfología y posicionamiento nuclear. Puede estar involucrada en la normalización del potencial de membrana por el estrés oxidativo y la regulación del aparato de Golgi para la migración celular (82).

En el estado normal la vimentina forma homopolímeros, pero en la activación astrogliar en condiciones patológicas la vimentina puede copolimerizar con GFAP para integrarse a los filamentos (80). La expresión de vimentina en el SNC de un adulto normal, solo se puede ver en la glía de Bergmann, glía radial y células ependimarias. En las redes formadas por GFAP en astrocitos reactivos se ha observado que la vimentina forma parte de una proteína asociada al citoesqueleto (74). Aunque la expresión de vimentina es baja en el SNC y el SNP de adultos, está implicada en varias neuropatías (83). Estudios muestran

que mientras la GFAP aumenta su expresión, la vimentina se reexpresa en el lugar proximal a la lesión especialmente en condiciones patológicas del SNC como en el caso de trauma, isquemia, crecimiento tumoral y enfermedades neurodegenerativas. Se puede observar que esta reexpresión o regulación positiva de la vimentina hace parte de la hipertrofia de los procesos celulares de los astrocitos activados (74,84).

1.3.3.3. Proteína S100B

La S100 es una proteína de unión a calcio, termolábil, que fue aislada por Moore en 1965, en cerebro bovino (85). Su nombre se deriva a que este fragmento es soluble en el sulfato de amonio saturado al 100% a pH neutro. La fracción dispone principalmente de dos polipéptidos, S100A1 y S100B. Aunque la S100 se expresa en diversos tipos celulares, el nivel de expresión de estos dos dímeros es mayor en el sistema nervioso (86). Son proteínas ácidas pequeñas con un tamaño de 21 KDa que traducen las señales de Ca^{2+} y forman homo y heterómeros. Funcionan como receptores del Ca^{2+} modificando sus niveles intracelulares para cambiar la función celular (87). Consta de 18 monómeros, cada monómero S100 consiste de dos dominios (N-terminal y C-terminal) de unión a Ca^{2+} hélice-bucle-hélice denominado *EF-hand* que permiten el reconocimiento de la proteína diana (88,89). Los enlaces de cobre y zinc cooperan en la unión de Ca^{2+} . La mayor parte de los genes de la S100 se encuentran en un *cluster* de cromosomas humanos 1q21 (brazo largo del cromosoma 21), conservado evolutivamente (88).

Aunque la S100 se encuentra de forma extracelular, estas moléculas también pueden funcionar como proteína sensor del calcio intracelular. Esta proteína puede regular los procesos por medio de distintos mecanismos. Algunas tienen isoformas específicas que modulan la S100 y pueden actuar de manera inhibitoria o excitatoria (86). Las proteínas S100 modulan diversos procesos intracelulares y extracelulares incluyendo la comunicación célula-célula, estructura celular, metabolismo energético, regulación de la división, diferenciación, movilidad y crecimiento celular, contracción y transducción de señales, transcripción, inhibición de la fosforilación, entre otras (86,87,90). Puede coordinar la dinámica de la red de tres elementos principales del citoesqueleto que constituye la morfología celular; microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios. La S100B extracelular está implicada en proceso de aprendizaje y la memoria.

Cabe resaltar que estas funciones se modulan con la regulación del Ca^{2+} , causando cambios conformacionales en la S100B (87).

Las S100 son una familia multigénica que comprende unos 25 miembros que tienen similitud en sus características estructurales y comparten aproximadamente 50% de homología de secuencia de aminoácidos y además se expresan diferencialmente en un gran número de tipos de células (86). No obstante, este trabajo se enfoca en un solo tipo, la proteína S100B (homodímero de la subunidad β). Representa el 0.2% del total de proteínas del sistema nervioso y se encuentra en la membrana del aparato de Golgi, membrana perinuclear y membrana plasmática sináptica, debido a su alta afinidad con lípidos lo que puede generar un cambio en las propiedades estructurales de la bicapa lipídica. La S100B cumple funciones intracelulares y extracelulares (89). Una de sus funciones principales es regular el ensamblaje de los filamentos intermedios tipo III y los microfilamentos (86). Su gran número de residuos hidrofóbicos la hace ser una proteína muy estable para interactuar con sus proteínas blanco como la tubulina, desmina o GFAP, mediante varios sitios de unión, específicamente a residuos que se encuentran en el dominio N-terminal. La unión directa a estas proteínas activan mecanismos de desensamble de los IFs lo que posibilita la correcta organización y remodelación de los IFs (86).

El dímero S100B se localiza en células específicas que presentan activación del Ca^{2+} , como en los astrocitos (87,91,92,98). Entre los roles que cumple se encuentran: promueve la extensión de neuritas, protege a la célula del daño oxidativo causado por iones de cobre, posee actividad neurotrófica y mitogénica, regula la fosforilación y degradación, ejerce un efecto autocrino en los astrocitos, estimula la proliferación de células gliales, induce aumento de Ca^{+2} en las células gliales y neuronales lo que puede producir muerte celular (87,92). Tiene un papel importante en la regulación de la polimerización de la tubulina, también interviene en la nucleación de los microtúbulos. Además estimula proteína quinasa nuclear que ayuda a la regulación de la morfología y ciclo celular (92). La S100B utiliza varias vías para su secreción al espacio extracelular como la ruta del aparato de Golgi, asociación de tubulina o actina. Una de las formas de liberar la S100B es por medio de la activación del receptor de serotonina 5-HT_{1A} o RAGE (86,90,98). Su inhibición podría generar un bloqueo en la proliferación de células gliales. Si bien la S100B dentro del SNC se puede encontrar en algunos oligodendrocitos, células de Schwann y algunas

poblaciones neuronales se reconoce más como un marcador específico de astrocitos que son las células donde principalmente se sintetiza y se expresa la proteína (74,93).

La concentración extracelular de S100B es clave para la respuesta fisiológica. En condiciones iónicas normales la regulación del Ca^{2+} por parte de la proteína S100B en el tejido nervioso se encuentra en concentración nanomolar lo que promueve la supervivencia neuronal (86). Sin embargo, la sobreexpresión de este dímero y la alteración en la homeostasis de Ca^{2+} se asocian con ciertas enfermedades neurodegenerativas o cáncer, debido a que las células muestran una disregulación del crecimiento celular (90). En cerebros con Alzheimer se ha encontrado aumento en los niveles de expresión de S100B en astrocitos reactivos. En cambio, la disminución en la expresión de la S100B puede generar como resultado disminución o inhibición del crecimiento celular como en el caso de pacientes con epilepsia (90). Se expresa en diferentes células y tejidos en enfermedades como la artritis reumatoide, lesiones inflamatorias, cáncer, enfermedad de Alzheimer, entre otras (94). Actualmente, la S100B se utiliza como marcador inmunohistoquímico en el diagnóstico e investigación de diferentes tipos de células tumorales (95) y en otras patologías que revelen cambios en la glía (88), incluyendo las originadas por virus neurotrópicos, como el virus de la enfermedad de Borna y el virus de la varicela zoster (96,97).

1.4 Respuesta de los astrocitos a la infección con el virus de la rabia: estado actual

Puesto que la rabia es una enfermedad causada por un virus neurotrópico, esto es, que infecta preferencialmente a las neuronas, la investigación en rabia ha estado dirigida a localizar el virus en las poblaciones neuronales y a estudiar su efecto sobre ellas *in vivo* o *in vitro* (2,5,7-10). No obstante, los histopatólogos y científicos expertos en rabia han coincidido en afirmar que aparte de la presencia del cuerpo Negri (el rasgo patognomónico de la rabia) en el pericarion de algunas neuronas, no se aprecian cambios morfológicos significativos en el tejido nervioso (2,5,8,29,99,100,101). La respuesta glial a la infección con rabia más conocida es la formación de los nódulos de Babes (V. Babes los describió inicialmente en 1892) en tejido encefálico de algunas muestras de origen humano o de

animales silvestres. Estos consisten de pequeños grupos aislados de microglía fácilmente identificables con la tinción de hematoxilina y eosina (2,29,99).

Al consultar revisiones de tema escritas por autores especializados en patología y patogénesis de la rabia poco se mencionan las células gliales y en particular los astrocitos (2,5,7,8,29,99,100). Los estudios ultraestructurales (microscopía electrónica) consultados tampoco hacen referencia a la presencia del virus dentro de células gliales (2,101-104) con excepción de un hallazgo de partículas virales en un solo astrocito de un ratón inoculado por vía intracerebral que los autores calificaron como “rara excepción” (105). Y mediante inmunohistoquímica fueron detectados antígenos rábicos en algunos oligodendrocitos del tejido nervioso de un paciente humano (106).

En condiciones *in vitro* el virus de la rabia también ha manifestado su predilección por las células de tipo neuronal (12) pero aun así en un estudio se reportó un porcentaje alto de astrocitos infectados (107). No obstante los estudios dirigidos a estudiar la respuesta de los astrocitos en rabia con métodos específicos para este tipo de células son escasos. En un trabajo experimental realizado en ratones inoculados con virus ‘fijo’ de la rabia se demostró reacción astrogliar moderada en la corteza cerebral y el hipocampo utilizando la técnica de oro sublimado de Cajal. La reacción se manifestó en una mayor intensidad de tinción y mayor tamaño de los astrocitos; esto último porque los procesos celulares se hicieron más robustos y alargados. Para lograr este efecto el autor llevó a cabo reinoculaciones sucesivas del virus por vía intracerebral (108).

Llama la atención la escasez de información sobre el uso de GFAP para estudiar la astrogliar en rabia. Se ha reportado reacción astrogliar manifestada en aumento de la inmunorreactividad a GFAP en el hipocampo y el cerebelo de encéfalo bovino (109,110). Igualmente se observó aumento en la reacción astrogliar revelada por inmunorreactividad de GFAP en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones pero no en la médula espinal (111). No obstante, en ratones transgénicos inoculados con virus de la rabia no hubo activación del gene promotor de GFAP (112). En estudios preliminares a este trabajo se comparó la inmunorreactividad de GFAP en el cuerpo calloso de ratones inoculados con rabia y sus controles sin haber encontrado diferencias significativas (113) mientras que sí se observó aumento de la inmunorreactividad a GFAP en el bulbo olfatorio de ratones por efecto de la infección con el virus (114).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Estudiar la respuesta citomorfológica de los astrocitos a la infección con el virus de la rabia mediante la evaluación de la inmunorreactividad de proteínas marcadoras y la ultraestructura celular en la corteza cerebral de ratones.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la inmunorreactividad de GFAP, vimentina y S100B en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia.
- Determinar, mediante microscopía electrónica, si el virus de la rabia infecta a los astrocitos y analizar sus posibles efectos sobre la estructura fina de estas células.

3. Materiales y métodos

3.1 Manejo de animales de laboratorio y obtención del virus rábico

Se utilizaron como modelo experimental 35 ratones (*Mus musculus*) hembras de la cepa ICR-CD1 (International Cancer Research) de 28 días de edad (adultos jóvenes). Todas las manipulaciones que se realizaron con los animales se llevaron a cabo dentro de una sala de alta de seguridad (S2) en el bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS). Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales y nutricionales de acuerdo con las normas éticas exigidas para la investigación con animales de laboratorio en Colombia (Ley 84 de 1989, Ley 1774 del 2016 y resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud) y se siguieron las normas éticas y legales reglamentadas para la investigación con animales de laboratorio y aprobadas por el Comité de Ética del INS y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Luego de realizar los procedimientos en el bioterio para obtener los encéfalos fijados en aldehídos, se trasladaron al Laboratorio de Morfología Celular (INS) para realizar el procesamiento para inmunohistoquímica o microscopía electrónica de acuerdo con protocolos previamente establecidos por el grupo de trabajo (9, 16, 116,117, 123-127,131).

El inóculo viral se obtuvo a partir de una alícuota de virus de la cepa CVS (Challenge Virus Standard) suministrado por el Laboratorio de Virología del INS. Para incrementar la cantidad de virus disponible se inocularon diez ratones lactantes cada uno con 0.03 ml de inóculo viral por vía intracerebral; cuatro días después de mostrar los primeros signos clínicos (anquilosamiento y piloerección) se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se extrajeron los encéfalos, se sometieron a maceración y se diluyeron en proporción 1:10 con una solución preparada con suero fetal bovino al 2%, penicilina 200 UI/ml y estreptomycin 4mg/ml; luego la solución se centrifugó y se distribuyó en alícuotas de 0.5

ml y estas se preservaron a -70°C hasta su utilización (9,117). Antes de iniciar los experimentos para cumplir con los objetivos del proyecto, se llevó a cabo la titulación de esta solución de inóculo viral siguiendo el método de Reed & Muench modificado (128).

3.2 Inoculación de los animales con el virus de la rabia y extracción de los cerebros

Para llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico y ultraestructural se inocularon 5 ratones por vía intramuscular (IM), en los músculos isquiotibiales de las extremidades posteriores, cada uno con 0,03 ml de inóculo viral en una dilución 1×10^{-1} y título viral equivalente a $10^{9,1}$ DL-50. Los controles fueron otros 5 animales inoculados por la misma vía con una cantidad similar de solución diluyente desprovista del virus (solución vehículo). Los animales infectados con el virus manifestaron los primeros signos de la enfermedad a las 72 horas post-inoculación (p.i.) pero alcanzaron la fase terminal a las 144 horas (6 días p.i.)

Adicionalmente se inocularon 3 animales por vía intracerebral (IC) cada uno con 0.03 ml, de una dilución 1×10^{-6} y título viral de $10^{10,1}$ DL-50, equivalente a $10^{4,1}$ DL-50. La inyección intracerebral se efectuó a través de la superficie dorsomedial del hueso parietal a una distancia prudente de la corteza frontal para evitar una lesión directa en esta que era la zona de estudio. De igual manera se inocularon con solución vehículo los 3 animales utilizados como controles. Los ratones inoculados con el virus rábico por esta ruta manifestaron signos avanzados de la enfermedad a los 5 días p.i.

En un tercer ensayo, 3 ratones se inocularon con el virus por la vía IM; luego, a las 48 h p.i., estos animales fueron inoculados con el virus por la ruta IC. El mismo tratamiento de inoculación, pero con solución vehículo, se siguió para los 3 ratones utilizados como controles de este experimento. Estos animales doblemente inoculados alcanzaron la fase terminal a los 5 días p.i.

En todos los casos los signos clínicos que determinaron el carácter terminal de la enfermedad fueron, principalmente, piloerección, temblor, parálisis de las extremidades posteriores en los inoculados por la ruta intramuscular y, finalmente, postración total

(escaso movimiento), notable pérdida de peso y temperatura corporal muy fría al tacto. Se eligió trabajar con animales en fase terminal de la enfermedad pues es cuando la rabia produce alteraciones importantes y cuantificables en el tejido nervioso (5,115). La mayoría de trabajos realizados por el grupo, aquí citados, se han llevado a cabo en esta condición.

Los ratones que alcanzaron la fase terminal y sus controles fueron tratados con una inyección de 0,2 ml de hidrato de cloral al 30% por vía intraperitoneal. A los 3 minutos los animales estaban bajo anestesia profunda. Rápidamente se cortó la piel y se sujetó el apéndice xifoides, luego se levantó la caja torácica, se realizó una cisura en el diafragma y posteriormente se cortaron las costillas lateralmente para tener expuesto el corazón. Pronto se introdujo una jeringa de insulina a través del ápice del ventrículo izquierdo y se conectó a una bomba peristáltica utilizada para impulsar los fluidos empleados en la perfusión; inicialmente, 30 ml de solución de fosfato salino (PBS) a pH 7,3 y luego paraformaldehído (PFA) al 4% o PFA 4% más glutaraldehído (GA) al 0,1% si eran muestras destinadas a procesamiento directo para microscopía electrónica (ME), aproximadamente 70 ml por cada ejemplar. A continuación se extrajeron los encéfalos, y se sumergieron en solución fresca de PFA al 4% (o PFA 4% más GA% al 2% para ME) y se mantuvieron a 4°C hasta el día siguiente (aprox. 20 horas), para continuar con el procesamiento destinado a estudio inmunohistoquímico y ultraestructural.

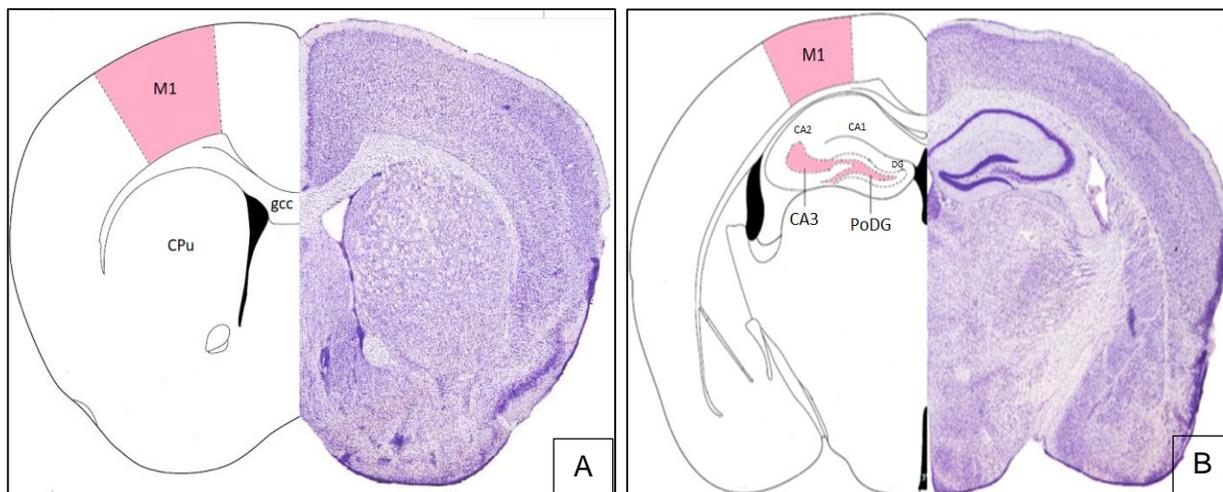
3.3 Descripción del área de estudio

El área seleccionada fue principalmente la corteza frontal, [FR según atlas de Valverde, (118)], en primer lugar, la corteza frontal anterior rostral al fórnix, dorsal al cuerpo caloso, el estriado y la decusación de la comisura anterior. En segundo lugar la corteza frontal posterior, caudal al fórnix y dorsal al hipocampo (Figura 3-1). Estas áreas comprenden funcionalmente la corteza motora primaria del ratón [M1 según atlas de ratón de Paxinos, (119)] (Figura 3-1) hasta ahora ha sido la zona más estudiada por el grupo de investigación con diferentes marcadores neuronales, técnica de Golgi y microscopía electrónica (9,14-16,115-117,122-127). Por lo tanto, es un referente neuroanatómico conocido.

Además el sistema motor es el más susceptible a los efectos de la infección con el virus de la rabia (5,7,100,120). Esta es el área de la corteza cerebral en donde inicialmente ingresa y se dispersa el virus de la rabia inoculado por vía intramuscular en ratones (120,121). Adicionalmente se hicieron observaciones en la formación hipocampal por estar

presente en el mismo plano de corte. En los animales que fueron inoculados por la ruta intracerebral todos los análisis neurohistológicos e inmunohistoquímicos se llevaron a cabo en el hemisferio contralateral al de las inoculaciones.

Figura 3-1: Imágenes de las áreas de estudio en plano coronal del cerebro de ratón.



A. Corte a nivel de la corteza motora anterior. **B.** Corte a nivel de la corteza motora posterior. M1, corteza motora primaria; gcc, rodilla del cuerpo caloso; CPu, caudado-putamen (estriado); CA1-CA3, regiones hipocampales del cuerno de Amón 1-3; DG, giro dentado; PoDG, capa polimórfica del giro dentado. Ilustraciones adaptadas del atlas de Paxinos (119).

3.4 Procesamiento de muestras para obtención de cortes en parafina

Para la observación de la histología básica y de posibles cambios histopatológicos convencionales inducidos por el virus de la rabia en el cerebro de los ratones se procesaron muestras (encéfalos completos) de 1 ratón control (no infectado) y dos ratones infectados mediante inclusión en parafina, obtención de cortes coronales y coloración de estos por la técnica de hematoxilina-eosina (H&E). En algunos de estos cortes se realizó también inmunohistoquímica para la proteína GFAP según protocolo descrito en el anexo A.

3.5 Inmunohistoquímica para marcadores de astrocitos

Para la técnica de inmunohistoquímica (Anexo B) se realizó el siguiente procedimiento: en un vibrátomo (Leica VT 1000S) se obtuvieron cortes coronales de los cerebros de 50 μm

de espesor, en sentido rostro-caudal, los cuales se recogieron en PBS, en cajas de vidrio (mini-Petri de 2.5 cm de diámetro y 1.5 cm de altura) manteniendo un volumen de 1.5 ml en cada caja. Durante todo el procedimiento inmunohistoquímico que se describe a continuación los cortes se dejaron en agitación y flotación constante a temperatura ambiente (20°C). Además, después de cada tratamiento, se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS. Al día siguiente de obtenidos los cortes estos se trataron con cloruro de amonio (NH₄Cl), durante 30 minutos para contrarrestar el efecto de los aldehídos utilizados en la fijación y luego con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 3% para bloquear la peroxidasa endógena. Después los cortes se incubaron en una solución compuesta por albúmina de suero bovino al 3%, suero equino normal al 3% y tritón 0.1% para bloquear sitios inespecíficos. A continuación, se retiró la solución de bloqueo y, sin lavar, los cortes se sometieron a incubación con el anticuerpo primario.

Luego de varios ensayos con diferentes diluciones para cada uno de los anticuerpos primarios (todos policlonales elaborados en conejo) se estandarizaron las siguientes: anti-GFAP (1:1000, Dako Ref: Z0334); anti-vimentina (1:1000, Abcam Ref: 137321) y anti-S100B (1:500, Abcam Ref: ab868). Esta incubación se dejó hasta el siguiente día (aproximadamente 20 horas). Después se procedió a la incubación en anticuerpo secundario (anti-conejo biotinilado Sigma en dilución 1:600), durante 2 horas, seguida por el tratamiento en solución del complejo avidina-biotina (ABC, Vectastain) durante 2 horas. Para el revelado de la inmunotinción se utilizó un kit comercial de diaminobencidina-níquel (DAB-N, Vectastain). Los cortes se extendieron en láminas cubiertas con gelatina para una mayor adhesión, se dejaron secar al ambiente y se montaron utilizando Entellan (Merck). De cada cerebro infectado se procesaron algunos cortes para inmunohistoquímica de antígenos rábicos utilizando un anticuerpo obtenido y probado experimentalmente por el grupo (137,138) con el fin de comprobar la infección y la presencia del virus en la corteza cerebral.

3.6 Morfometría de células inmunorreactivas

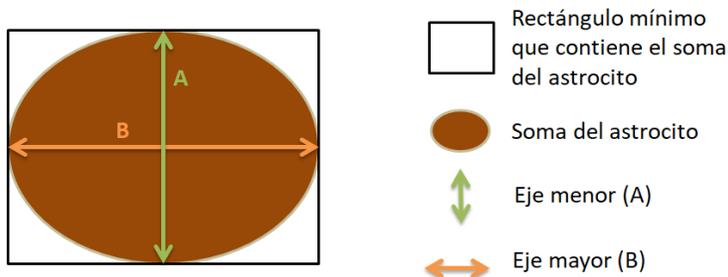
Se realizaron mediciones de los diámetros del cuerpo celular o soma de los astrocitos positivos para GFAP y S100B de ratones infectados y no infectados. Se capturaron 50 imágenes por cada corte correspondientes a las regiones de la corteza cerebral anterior y posterior, con una cámara digital marca *Evolution VF* de cinco megapíxeles, con un lente

óptico que se acopló a un microscopio. El objetivo utilizado fue 40X y lente ocular de 2.0X para un aumento total de 80X. El análisis morfométrico se realizó con un procesador Intel Pentium 4. Las dimensiones y magnitudes se obtuvieron según las técnicas e indicadores morfométricos con el programa *Capture Pro*.

Las imágenes se midieron en megapíxeles y se convirtieron automáticamente a micrómetros (μm) según la calibración del software. Se utilizó la opción distancia lineal de la aplicación capture pro. La variable de medición fue el diámetro del soma. Se midieron 200 células en un corte para calcular el promedio de las mediciones para cada variable. El diámetro fue la dimensión dada por la distancia entre dos puntos, la medida de la longitud de una línea recta trazada entre dos puntos opuestos del óvalo, cuya línea debía pasar por el centro de la célula. El área superficial de las células gliales se calculó en una imagen plana (bidimensional) obtenida en cortes coronales; esta área representó el rectángulo mínimo que contenía cada célula y la fórmula fue $S = A \times B$ donde A era diámetro mayor (eje mayor) y B el diámetro menor (eje menor) (133-136) (Figura 3-2).

La rectangularidad se midió directamente con la opción de medición angular, utilizando la opción de factor de forma del programa capture pro ($A/\text{Área mínima del rectángulo}$). En este caso se contorneó el límite externo o perímetro de la célula y la interpretación del indicador es que mientras más se acerca a 1 (0,8 o más) la estructura es más rectangular, si ocurre lo contrario, mientras más se aleja de 1 (menos de 0,8), es menos rectangular, o sea, la estructura puede ser más ovalada o irregular. Se incluyeron sólo las células cuya rectangularidad era de 0,8 o más. Quedaron exentas de contar o ser medidas las células con un corte oblicuo o longitudinal, o sea, cuando tuvieran una rectangularidad menor de 0,8, para evitar los sesgos (Figura 3-2). Por último, se calculó el volumen de la célula por la ecuación de estructuras ligeramente ovoides de Palkovits et al. (136), que utiliza el diámetro mayor y menor y se usa cuando la diferencia entre los diámetros es estrecha. $V = \pi/6 \cdot A \cdot B^2$ Donde: A: diámetro mayor: B: diámetro menor.

Figura. 3-2: Esquema que ilustra los detalles de la técnica morfométrica.



Fuente: Autor

3.7 conteos celulares y análisis densitométrico

Para la cuantificación de la inmunorreactividad de cada uno de los marcadores se seleccionaron los casos (unidades experimentales), (5 para las inoculaciones por vía intramuscular y 3 para los otros experimentos) con sus respectivos controles, para contar el número de células que expresaron cada uno de los marcadores. En cada unidad experimental se seleccionaron 3 cortes (repeticiones) para realizar los conteos celulares en la corteza cerebral. El área de conteo correspondió a campos de 1 mm² de la corteza motora anterior y posterior, dorsal al cuerpo caloso, de acuerdo con la descripción de la sección 3.3. Para ello se utilizó un microscopio Zeiss dotado con un micrómetro de malla Netzmiiier de 1 mm².

En áreas de la corteza motora que exhibieron inmunorreactividad densa en el neuropilo se llevó a cabo también el estudio por densitometría óptica siguiendo un procedimiento de selección de muestras como el descrito en el párrafo anterior y utilizado por el grupo en trabajos anteriores (125,127,131). Para ello se tomaron campos cada uno de 0.5 mm² que incluyeran células y neuropilo de la corteza motora anterior y posterior. Se capturaron las imágenes (programa *Capture Pro*) y se procesaron para obtener valores que reflejaran la intensidad de luz transmitida medida en una escala de 0 (0% de luz transmitida o negro) a 255 (100% de luz transmitida o blanco) por cada 'pixel' con ayuda del programa ImageJ.

3.8 Análisis estadístico

Para la comparación de los datos obtenidos entre los grupos control, con cada uno de los grupos experimentales, primero se realizó la prueba de normalidad (prueba Shapiro-wilks

modificado) para definir si se utilizaban pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas. Luego los datos se analizaron con la prueba estadística no paramétrica (prueba de rangos de Wilcoxon-Mann-Whitney de dos colas), aplicando una fórmula y una tabla diseñadas para trabajar con muestras pequeñas (132). Adicionalmente, cuando fue indicado se aplicaron pruebas de comparación de medias (Test de Student) para muestras independientes y se determinaron las diferencias estadísticamente significativas entre los valores comparados, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Para las gráficas y el análisis estadístico se utilizó el programa Origin 7.0 (*Scientific Graphing and Data Analysis Software*) (133).

3.9 Microscopia electrónica

3.9.1 Microscopía electrónica convencional

En un vibrátomo se obtuvieron rodajas de encéfalos de 200 μm de espesor en plano coronal del material fijado con PFA 4% y GA 2%. Inicialmente las rodajas se lavaron en tampón de fosfatos (TP) por 1 hora. Luego se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora y nuevamente se lavaron con TP. A continuación los cortes se deshidrataron utilizando una serie de soluciones de concentraciones ascendentes de etanol (50, 70, 80, 95, 100%) durante 15 minutos en cada una de ellas, seguida por tratamiento con óxido de propileno (OP) en dos cambios de 15 minutos cada uno. Luego se llevó a cabo la infiltración gradual de los cortes en resina epóxica Epón-Araldita (EA) iniciando con una combinación de 2 partes de OP y 1 de EA (2OP:1EA) seguida por 1OP:1EA y 1OP:2EA durante 2 horas en cada tratamiento para finalizar dejando los cortes en resina pura EA hasta el día siguiente a 4°C.

Luego los cortes completos se transfirieron a láminas portaobjetos y se montaron en resina fresca, se colocaron monedas de bajo peso sobre la laminilla cubreobjetos y se sometieron a temperatura de 70°C dentro de un horno para polimerizar el montaje durante 24 horas. Los portaobjetos y las laminillas fueron tratados previamente con una solución antiadherente (Sigmacote®). Este método permitió luego seleccionar fragmentos completos de la corteza cerebral con la orientación necesaria para ubicar las células estudiadas en un área determinada y una capa específica de la corteza (9). A partir de este

material se separaron pequeños fragmentos (1 mm²) con una cuchilla y se pegaron con cianocrilato en el extremo plano de bloques de resina previamente polimerizados. Se obtuvieron cortes semifinos (700 nm), en un ultramicrotomo Sorvall, que se recogieron en lámina portaobjetos para colorearlos con azul de toluidina y observarlos en el microscopio óptico. Luego, de los mismos bloques, se obtuvieron cortes ultrafinos (60 nanómetros de espesor) en un ultramicrotomo LKB. Estos se recogieron en rejillas de cobre, se trataron secuencialmente con acetato de uranilo y citrato de plomo para aumentar el contraste y se observaron en el microscopio electrónico (ME). Se tomaron 50 fotografías de los astrocitos de diferentes rejillas de cada tipo de muestra (2 controles y 3 infectadas con el virus) con la cámara digital incorporada al microscopio (Anexo C).

3.9.2 Inmunomicroscopía electrónica

Se utilizó el procedimiento denominado 'inmunomicroscopía electrónica pre-imbibición' (PIEM) (129) de acuerdo con la experiencia previa en el grupo (9,130). Cortes coronales de cerebros, de 100 µm de espesor, obtenidos en vibrátomo, se procesaron inicialmente para inmunohistoquímica con GFAP teniendo en cuenta las siguientes variaciones al protocolo descrito en la sección 3.5: 1) para facilitar la penetración de los anticuerpos, antes de la incubación en la solución de bloqueo los cortes se trataron sucesivamente con soluciones de etanol 10%, 20%, 10% por 5 minutos en cada una. Luego se incubaron en la solución de bloqueo (sin tritón) durante 1 hora. 2) El revelado se llevó a cabo con DAB (MP-Biomedicals) preparado a partir de pastillas en concentración 1% (peso a volumen). Luego los cortes se procesaron para ME siguiendo el procedimiento ya descrito en la sección 3.9.1. Esto permitió hacer primero la localización de las células marcadas y seleccionar pequeños fragmentos de los cuales luego se obtenían los cortes semifinos para microscopía óptica y ultrafinos para microscopía electrónica. La reacción entre el tetróxido de osmio (uno de los reactivos utilizados para ME) y la DAB forma un precipitado que permite distinguir fácilmente en el ME a las células inmunorreactivas (9,130). Se tomaron 50 fotos de los astrocitos marcados con GFAP (Anexo C). Con el mismo procedimiento también realizó inmunomicroscopía electrónica para rabia.

4. Resultados

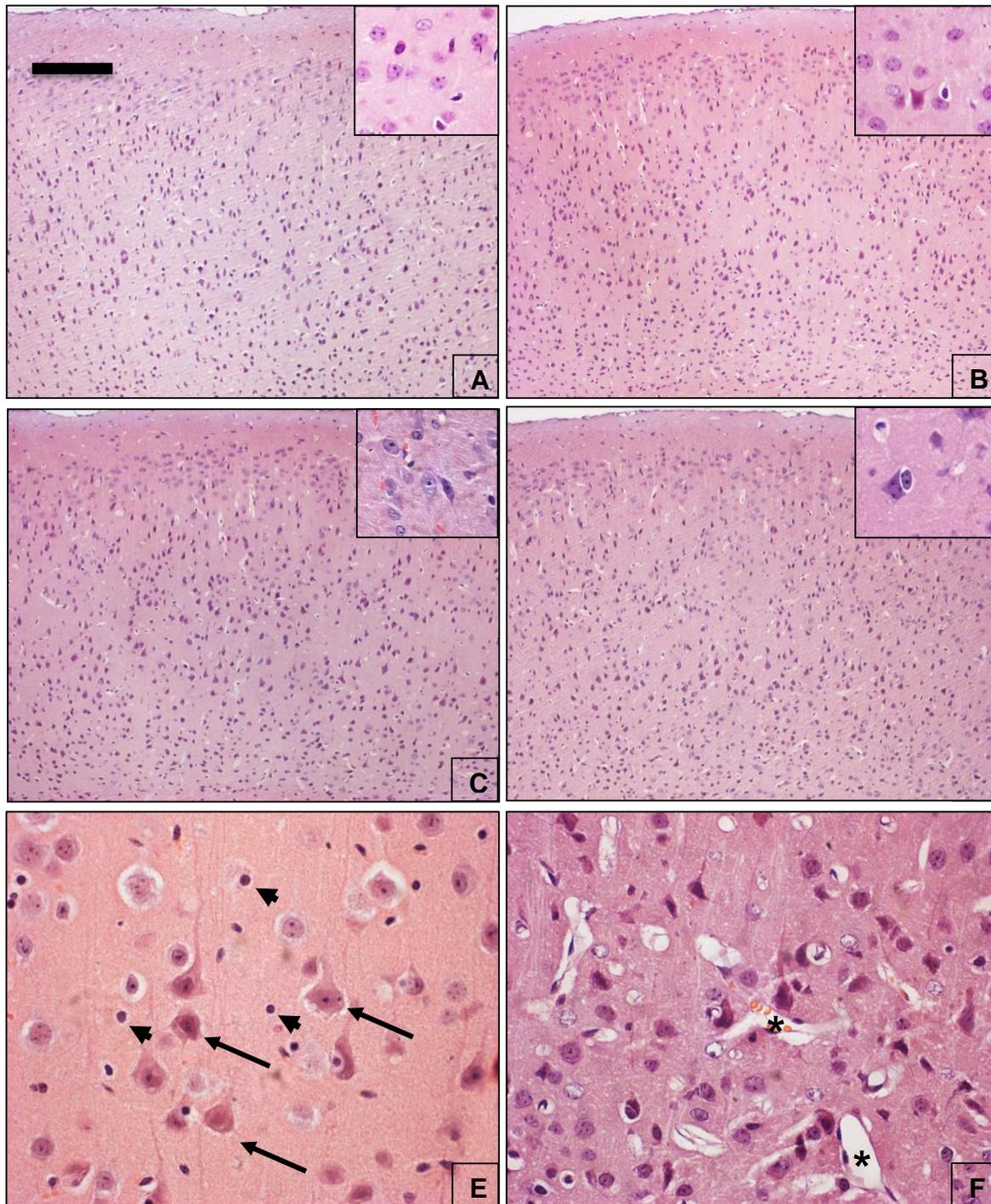
4.1 Descripción neurohistológica básica

En una vista panorámica de la corteza cerebral motora de los ratones se observó un patrón de distribución uniforme de células en todas las capas, con excepción de la capa I en donde el número de células fue notablemente menor (Figura 4-1 A - D). En mayor aumento se distinguen los núcleos más pequeños e intensamente basofílicos, sin citoplasma aparente a su alrededor, que corresponden a células gliales mientras que las neuronas son de mayor tamaño y sus núcleos además de ser más grandes se tiñen apenas ligeramente (Figuras 4-1 E y F).

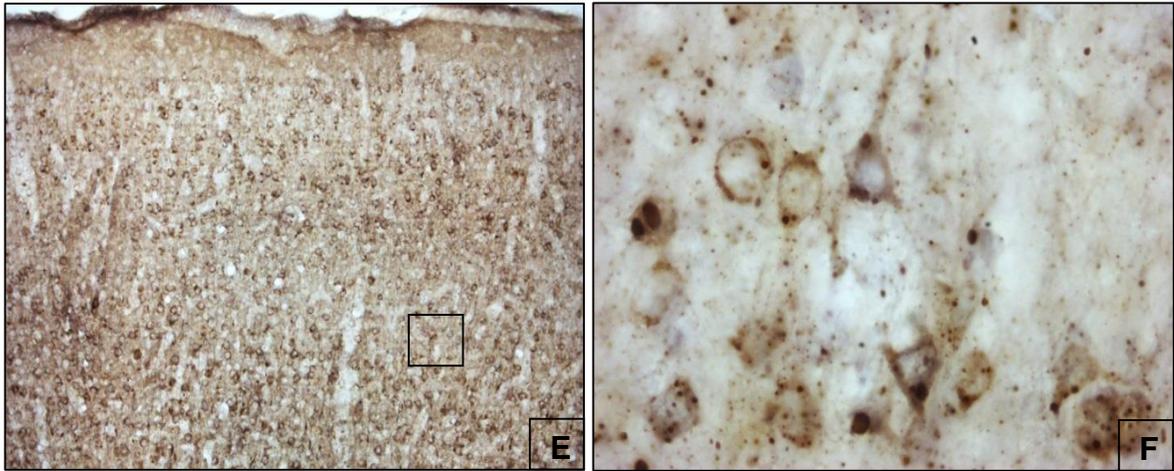
Al comparar las muestras de los animales inoculados con el virus de la rabia (Figuras 4-1 C y D) y sus controles (Figuras 4-1 A y B), no se observaron diferencias en el patrón de distribución de las células. En mayor aumento el único hallazgo significativo fue el mayor diámetro de los vasos sanguíneos (vasodilación) con presencia frecuente de eritrocitos en las muestras infectadas, a pesar de ser material fijado por perfusión (Figura 4-1 C (recuadro) y F).

Con la coloración H & E no se observaron las inclusiones citoplasmáticas eosinófilas (cuerpos de Negri) características de la infección natural (virus calle) por rabia. Por lo tanto, en estas muestras no fue posible confirmar el diagnóstico histológico de la infección.

Figura 4-1: Tinción H&E e inmunohistoquímica de rabia en la corteza cerebral de ratón.



A y B. Corteza motora de ratones controles. **A.** Corteza anterior. **B.** Corteza posterior. **C y D.** Corteza motora de ratones infectados. **C.** Corteza anterior. **D.** Corteza posterior. No se observan diferencias entre los controles y los infectados. 2.5X. Recuadros en 10X. **E.** Corteza motora anterior en controles. Se observan perfiles de neuronas piramidales (flechas) y núcleos de células gliales (puntas de flecha). **D.** Corteza motora anterior en infectados. Se notan los vasos sanguíneos dilatados (asteriscos), algunos con eritrocitos. Barra: 100um

Figura 4-1: (Continuación)

E. Panorámica de la inmunohistoquímica para rabia en corteza motora (2.5X). **F.** Detalle de neuronas con inclusiones intracitoplasmáticas (cuerpos de Negri) en el pericarion. En el núcleo no se observa inmunorreactividad al virus de la rabia (40X).

La técnica inmunohistoquímica permitió evidenciar la diseminación de los antígenos virales a través de toda la corteza cerebral (Figura 4-1 E) y las áreas subcorticales. En mayor aumento la inmunorreactividad se observó dentro del pericarion el neuropilo circundante. Además, se revelaron abundantes inclusiones intracitoplasmáticas, intensamente inmunorreactivas, semejantes a cuerpos de Negri, dentro del citoplasma de las neuronas y en el neuropilo (Figura 4-1 F).

4.2 Inmunorreactividad a GFAP en astrocitos de ratones inoculados por vía intramuscular

En los cortes histológicos obtenidos a partir de muestras incluidas en bloques de parafina la inmunohistoquímica reveló un escaso número de células GFAP+. Por esta razón se descartó hacer análisis cuantitativo en este material. En los pocos astrocitos marcados la inmunotinción demarcó la morfología del citoplasma de los astrocitos como un anillo alrededor del núcleo (no inmunorreactivo y contrastado con hematoxilina) y los procesos celulares emergiendo en dirección radial. La imagen fue similar tanto en los controles como en los infectados (Figura 4-2 A-D).

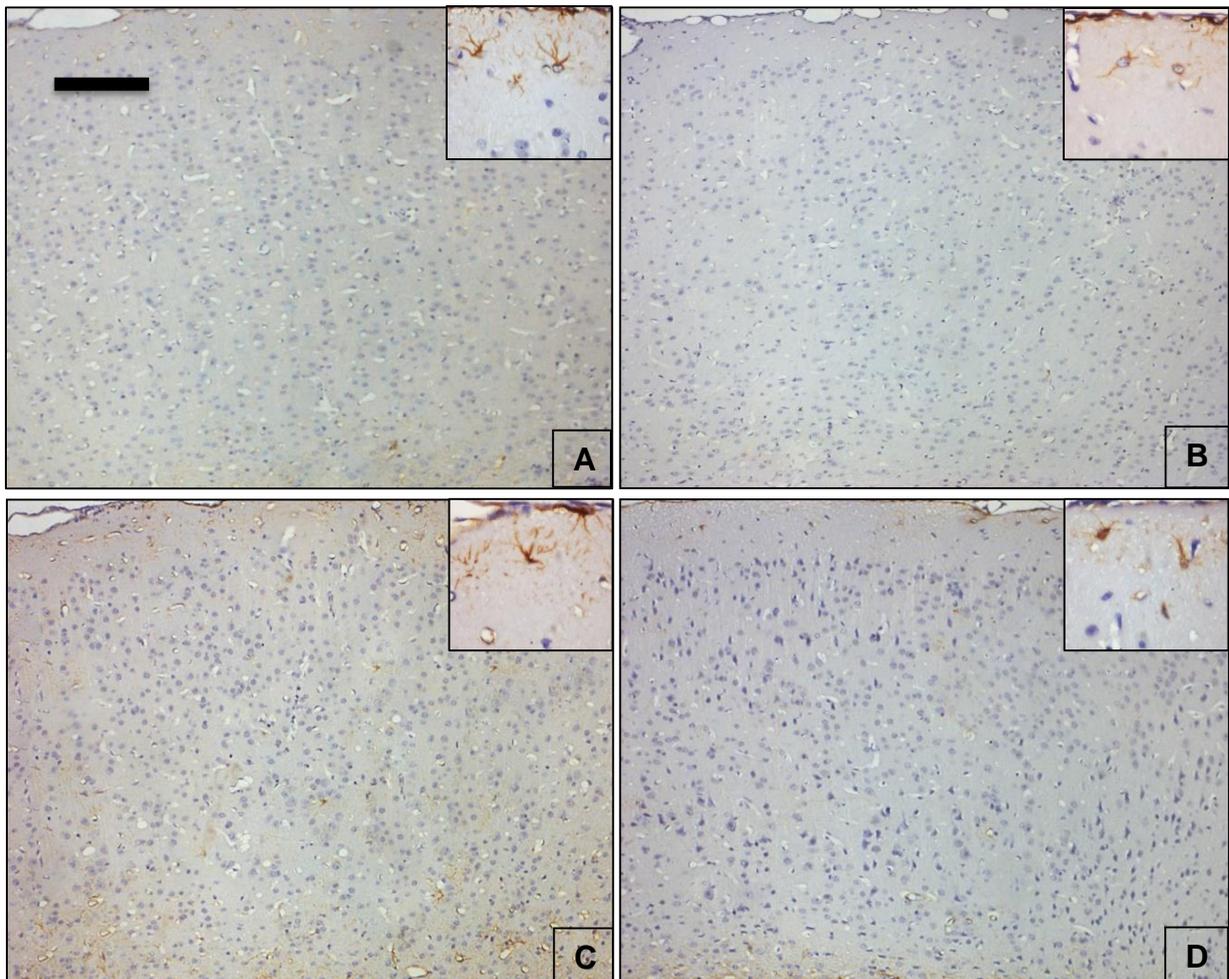
En los cortes obtenidos en vibrátomo se observó intensa inmunorreactividad a GFAP en las capas I y VI de la corteza cerebral pero muy escasa en las capas intermedias (II a V).

La imagen panorámica en los controles y los infectados fue muy similar, a primera vista, no se notó algún cambio por efecto de la infección (Figura 4-3 A-D). Los conteos de células GFAP+ en las dos capas inmunorreactivas no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los infectados en ninguna de las dos áreas: en la corteza motora anterior capas I ($P < 0,582$) y VI ($P < 0,387$) (Figura 4-3 G; Tabla 4-1) ni en la corteza motora posterior capas I ($P < 0,473$) y VI ($P < 0,841$) (Figura 4-3 G; Tabla 4-2).

No obstante, al comparar el tamaño de las células GFAP+ medido sólo en los astrocitos que revelaban la morfología completa (cuerpo celular y sus procesos radiales) sí se halló diferencia estadísticamente significativa. La infección generó un mayor tamaño en el cuerpo celular de los astrocitos. El área y el volumen calculados del soma de las células positivas para GFAP+ fueron mayores en los ratones infectados ($69,6 \pm 19,3 \mu\text{m}^2$ y $323,3 \pm 139,3 \mu\text{m}^3$) comparados con los de los controles ($53,6 \pm 16,3 \mu\text{m}^2$ y $315,4 \pm 99,1 \mu\text{m}^3$) ($P < 0,0003$) (Figura 4-4). Estas medidas fueron obtenidas de acuerdo con la descripción previamente realizada en la sección 3.6. En la Figura 4.3 E y F se exhiben imágenes de un astrocito en donde se señalan las mediciones del diámetro de su cuerpo celular (aprox. $10 \mu\text{m}$). Este dato es parte de la fórmula para obtener el diámetro y el volumen.

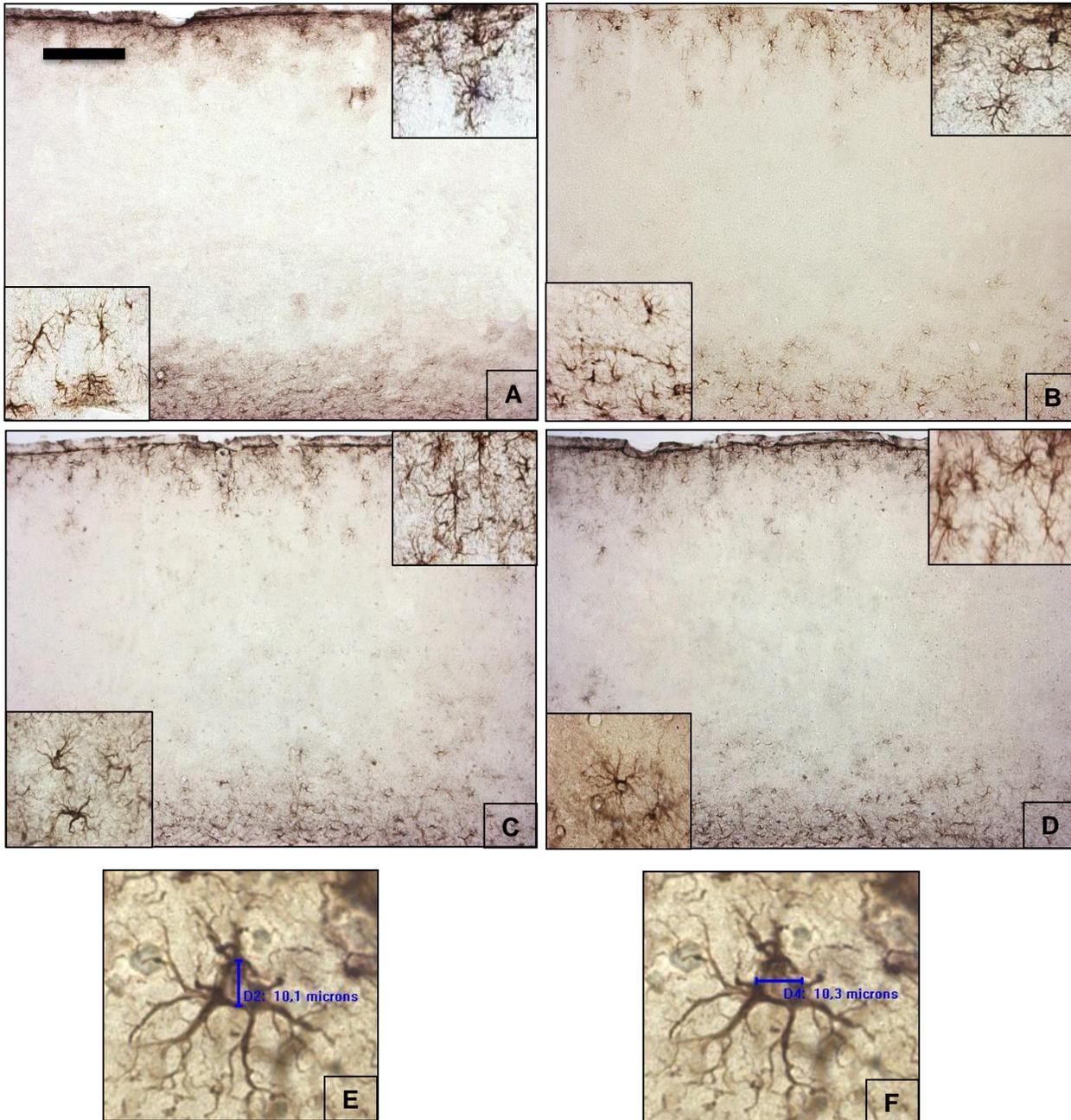
Por otra parte, hubo tendencia al aumento de la inmunorreactividad a GFAP medida por densitometría óptica en astrocitos de los infectados (aunque no fue estadísticamente significativa). A partir de valores de intensidad de luz transmitida en una escala de 0 (0% de luz transmitida o negro) a 255 (100% de luz transmitida o blanco) por cada 'pixel', se calculó la densitometría óptica con el programa de análisis de imágenes. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la inmunorreactividad a GFAP en la corteza anterior, capas I ($P < 0,074$) y VI ($P < 0,108$) (Tabla 4-3) ni en la corteza posterior, capas I ($p < 0,389$) y VI ($P < 0,383$) (Tabla 4-4), aunque los valores de transmitancia fueron menores (mayor inmunotinción a GFAP) en todas las muestras de los infectados (Tablas 4-3 y 4-4).

Figura 4-2. Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes en parafina (inoculación intramuscular).



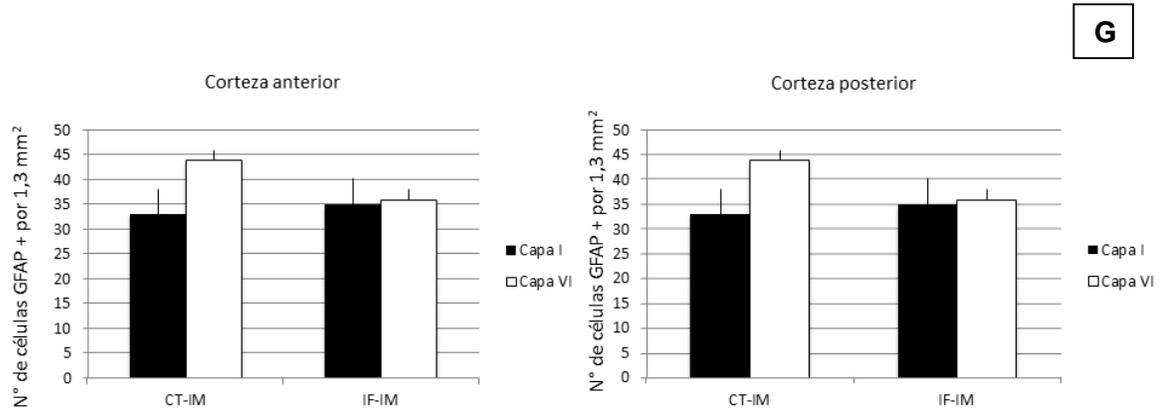
A y B. Corteza cerebral motora en animales controles **A.** Corteza anterior. **B.** Corteza posterior. **C y D.** Corteza motora de animales inoculados por la vía intramuscular **C.** Corteza anterior **D.** Corteza posterior. Se pueden observar algunas células con su citoplasma y prolongaciones celulares. En los recuadros ubicados en la margen superior derecha de cada imagen se observan con mayor detalle las células GFAP+ (Imágenes en 10X y recuadros en 40X). Barra: 100um

Figura 4-3. Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes de vibrátomo (inoculación intramuscular).



A y B. Corteza motora de ratones controles. **A** Corteza anterior. **B.** Corteza posterior. **C y D.** Corteza motora de ratones inoculados con rabia por vía intramuscular. **C.** Corteza anterior. **D,** Corteza posterior. La inmunotinción a GFAP se concentra en las capas I y VI y no se observan cambios por efecto de la infección. En los recuadros de cada imagen se detalla la morfología de los astrocitos (Imágenes en 10X y recuadros en 40X). **E y F** Imágenes de un mismo astrocito en donde se señalan las mediciones del diámetro del cuerpo celular (20X). Barra: 100um

Figura 4-3: (Continuación)



G. Diagramas que ilustran el resultado de los conteos de células inmunorreactivas a GFAP. No hubo diferencias al comparar controles (CT) con infectados (IF) en la capa I de las dos áreas corticales (barras negras), pero sí una ligera pérdida de astrocitos GFAP+ en la capa VI de los infectados (barras blancas) (no estadísticamente significativa).

Tabla 4-1. Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora anterior (inoculación intramuscular).

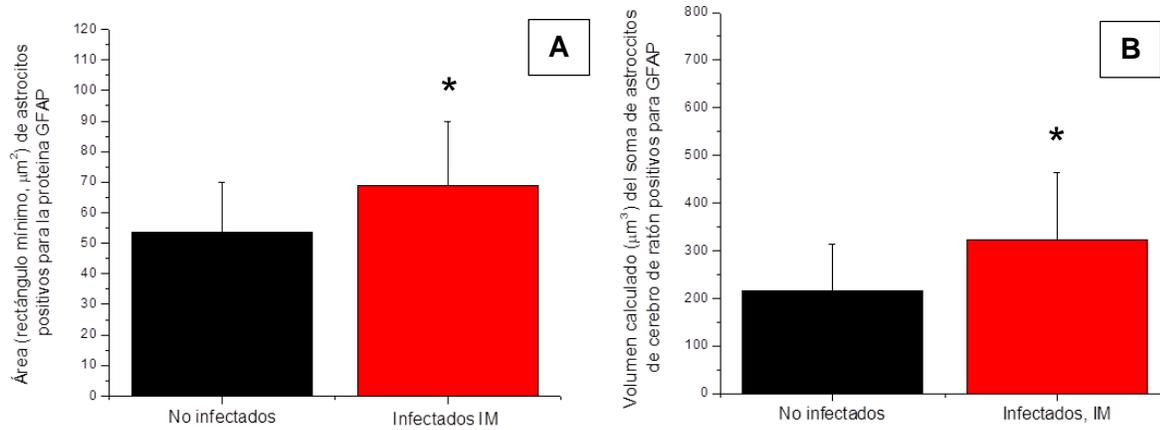
Capa	Muestras de controles					No. células por capa	Muestras de infectados					Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
I	35	40	32	32	28	33,40±1,99	31	34	38	38	33	34,80±1,39	0,582
VI	73	30	36	47	34	44,00±7,77	39	26	36	41	39	36,20±2,67	0,387
Total	108	70	68	79	62	77,40±8,12	70	60	74	79	71	70,80±3,12	0,481

Datos del número de células inmunorreactivas a GFAP en las capas I y VI de la corteza motora anterior de ratones infectados con virus de la rabia por vía intramuscular y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza. Cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

Tabla 4-2. Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora posterior (inoculación intramuscular).

Capa	Muestra de controles					No. células por capa	Muestra de infectados					Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
I	28	35	31	26	33	30,60±1,63	32	27	38	32	33	32,40±1,74	0,473
VI	59	53	40	31	29	42,40±5,93	47	48	42	33	35	41,00±3,05	0,841
Total	87	88	71	57	62	73,40±6,32	79	75	80	65	68	73,40±2,97	1,000

Datos del número de células inmunorreactivas para GFAP en las capas I y VI de la corteza motora posterior de ratones infectados con virus de la rabia por vía intramuscular y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza. Cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

Figura 4-4: Comparación del área y volumen del soma de las células positivas para GFAP (inoculación intramuscular).

Datos del tamaño expresado en área y volumen del cuerpo celular de los astrocitos inmunorreactivos a la proteína GFAP en la corteza cerebral de los controles y los infectados por vía intramuscular. **A.** Comparación del área (en micrómetros cuadrados) del rectángulo mínimo que abarca a cada uno de los astrocitos. **B.** Comparación del volumen (en micrómetros cúbicos) del soma de los astrocitos. Las diferencias en área y volumen fueron estadísticamente significativas ($n=200$ células, $P<0,0003$).

Tabla 4-3. Densitometría óptica en células GFAP+ de la corteza motora anterior de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular).

Muestra	Capa I		P valor	Capa VI		P valor
	Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)			Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
	Controles	Infectados		Controles	Infectados	
1	66,619±5,99	61,509±5,67	0,074	53,261±5,28	50,700±6,16	0,108
2	66,148±8,21	45,487±2,18		56,734±4,15	51,045±4,81	
3	73,661±9,93	50,242±5,00		65,470±8,13	45,145±6,58	
4	69,402±7,50	70,165±3,21		63,955±4,01	60,262±2,63	
5	63,306±3,06	59,702±5,72		59,813±4,09	59,134±6,50	
Promedio	67,824±3,91	57,434±9,70		59,846±5,03	53,257±6,34	

Datos correspondientes a las mediciones de transmitancia (luz transmitida) de la inmunotinción de GFAP en la corteza motora anterior de ratones inoculados con el virus de la rabia y sus controles. Cada valor corresponde al promedio obtenido en 10 células por corte. Nótese que en la mayoría de datos comparados los valores son menores (mayor inmunorreactividad) en los infectados aunque la diferencia consolidada no es estadísticamente significativa. Lecturas se realizaron mediante el programa *Image J*.

Tabla 4-4. Densitometría óptica de células GFAP+ en la corteza motora posterior de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular).

Muestra	Capa I		P valor	Capa VI		P valor
	Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)			Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
	Controles	Infectados		Controles	Infectados	
1	84,776±3,60	67,537±7,83	0,389	77,868±5,12	64,930±6,41	0,383
2	64,769±11,69	63,558±11,27		56,733±0,80	51,723±7,53	
3	50,684±1,43	52,533±2,09		53,263±3,12	49,843±6,20	
4	52,265±5,27	42,779±2,24		40,832±3,59	33,276±2,89	
5	65,429±9,65	57,186±2,00		66,300±8,68	57,515±15,64	
Promedio	63,585±13,67	56,719±9,69		58,999±13,94	51,457±11,74	

Datos correspondientes a las mediciones de transmitancia (luz transmitida) de la inmunotinción de GFAP en la corteza motora posterior de ratones inoculados con el virus de la rabia y sus controles. Cada valor corresponde al promedio obtenido en 10 células por corte. Nótese que en la mayoría de datos comparados los valores son menores (mayor inmunorreactividad) en los infectados aunque la diferencia consolidada no es estadísticamente significativa. Lecturas se realizaron mediante el programa *Image J*

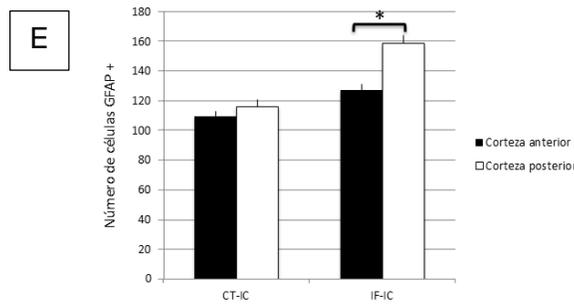
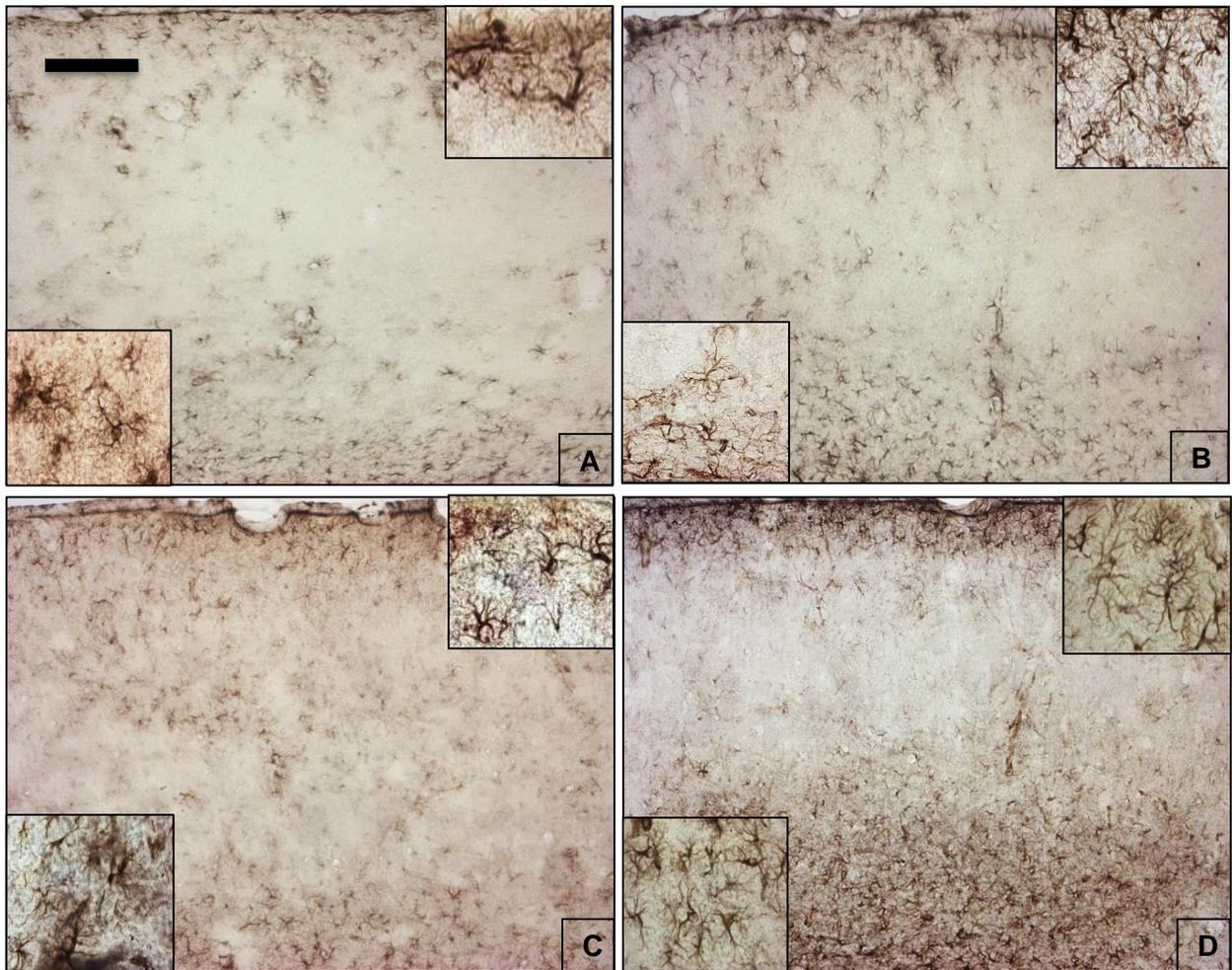
4.3 Inmunorreactividad a GFAP en astrocitos de ratones inoculados por vía intracerebral

La imagen panorámica observada en el material obtenido a partir de animales inoculados por vía intracerebral fue similar a la descrita anteriormente para los inoculados por la ruta intramuscular; fue mayor la inmunorreactividad a GFAP en las capas corticales I y VI. No obstante, se evidenció mayor cantidad de células GFAP+ en las capas intermedias, en comparación con los intramusculares, tanto en los controles como en los infectados (Figura 4-5 A-D). Los conteos de células inmunorreactivas a GFAP arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los infectados en la corteza motora anterior ($P < 0,035$) (Figura 4-5 E; Tabla 4-5), y posterior ($P < 0,004$) (Figura 4-5 E; Tabla 4-6).

Además, al comparar el tamaño de las células GFAP+ medido sólo en aquellas que revelaban la morfología completa (cuerpo celular y sus procesos) también se halló diferencia estadísticamente significativa. La infección generó un mayor tamaño de los astrocitos. El área y el volumen calculados del soma de las células positivas para GFAP fueron mayores en los ratones infectados ($96,7 \pm 27,1 \mu\text{m}^2$ y $508,1 \pm 224,1 \mu\text{m}^3$) comparados con los de los controles ($79,7 \pm 21,4 \mu\text{m}^2$ y $398,2 \pm 201,7 \mu\text{m}^3$) ($P < 0,00010$) (Figura 4-6).

Así mismo la inoculación intracerebral del virus generó aumento, esta vez sí estadísticamente significativo, de la inmunorreactividad a GFAP medida por densitometría óptica en las células GFAP+ de los infectados. Las diferencias fueron significativas en la corteza motora anterior ($P < 0,001$) y la corteza motora posterior ($P < 0,013$) (Tabla 4-7).

Figura 4-5. Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes de vibrátomo (inoculación intracerebral).



A y B. Corteza motora de ratones controles. **A.** Corteza anterior. **B.** Corteza posterior. **C y D.** Corteza motora de ratones inoculados con rabia por vía intracerebral. **C.** Corteza anterior. **D.** Corteza posterior. Aunque la GFAP+ marca los astrocitos a lo largo de la corteza motora en ambos casos la inmunotinción se concentra en las capas I y VI. En los recuadros de cada imagen se detalla la morfología de los astrocitos (Imágenes en 10X y recuadros en 40X). **E.** Diagramas que ilustran el resultado de los conteos de células inmunorreactivas a GFAP. Se encontraron diferencias significativas al comparar controles (CT) con infectados (IF) en la corteza posterior de los infectados (barras blancas) y en la corteza posterior (barras negras). Barra: 100um

Tabla 4-5. Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora anterior (inoculación intracerebral).

Capa	Muestra de controles			Promedio No. células por capa	Muestra de infectados			Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3		1	2	3		
I	42	32	38	37,33±2,90	44	40	47	43,67±2,02	0,157
II	5	4	4	4,33±0,33	5	4	3	4,00±0,57	0,649
III	2	2	3	2,33±0,33	3	3	4	3,33±0,33	0,101
IV	2	1	2	1,67±0,33	3	4	4	3,67±0,33	0,013**
V	11	14	9	11,33±1,45	10	8	12	10,00±1,15	0,514
VI	53	48	55	52,00±2,08	62	65	60	62,33±1,45	0,019
Totales	115	101	111	109,00±4,16	127	124	130	127,00±1,73	0,035**

** Estadísticamente significativo.

Datos del número de células inmunorreactivas para GFAP en todas las capas de la corteza anterior de ratones infectados con virus de la rabia por la vía intracerebral y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza, cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

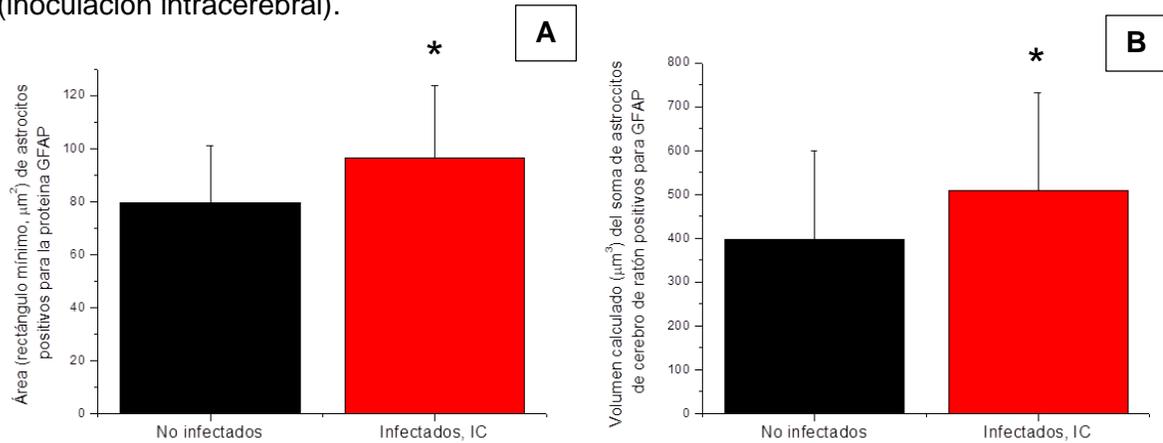
Tabla 4-6. Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora posterior (inoculación intracerebral).

Capa	Muestra de controles			Promedio No. células por capa	Muestra de infectados			Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3		1	2	3		
I	43	37	43	41,00±2,00	49	47	44	46,67±1,45	0,090
II	3	3	6	4,00±1,00	3	4	5	4,00±0,57	1,000
III	3	1	4	2,67±0,88	3	3	6	4,00±1,00	0,375
IV	3	2	5	3,33±0,88	5	4	4	4,33±0,33	0,379
V	11	5	14	10,00±2,64	17	11	10	12,67±2,18	0,482
VI	49	61	54	54,67±3,48	91	82	88	87,00±2,64	0,002**
Totales	112	109	126	115,67 ±5,23	198	151	157	158,67±4,97	0,004**

** Estadísticamente significativo.

Datos del número de células inmunorreactivas para GFAP en todas las capas de la corteza posterior de ratones infectados con virus de la rabia por la vía intracerebral y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza, cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

Figura 4-6: Comparación del área y volumen del soma de las células positivas para GFAP (inoculación intracerebral).



Datos del tamaño expresado en área y volumen del cuerpo celular de los astrocitos inmunorreactivos a la proteína GFAP en la corteza cerebral de los controles y los infectados por vía intracerebral. **A.** Comparación del área (en micrómetros cuadrados) del rectángulo mínimo que abarca a cada uno de los astrocitos. **B.** Comparación del volumen (en micrómetros cúbicos) del soma de los astrocitos. Las diferencias en área y volumen fueron estadísticamente significativas (n=200 células, P<0,00010).

Tabla 4-7. Densitometría óptica de la GFAP+ en la corteza cerebral de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intracerebral).

Muestra	Corteza anterior		Corteza posterior		P valor
	Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
	Controles	Infectados	Controles	Infectados	
1	44,389±10,54	30,392±7,00	40,988±3,97	24,114±5,95	0,001**
2	48,670±8,94	24,443±7,12	43,465±8,09	23,868±6,05	
3	51,208±6,59	25,553±9,05	48,963±10,48	24,023±6,10	
Promedio	48,089±3,44	26,796±3,16	44,472±4,08	24,001±0,12	

** Estadísticamente significativo.

Datos correspondientes a las mediciones de transmitancia (luz transmitida) de la inmunotinción de GFAP en la corteza motora anterior y posterior de ratones inoculados con el virus de la rabia por vía intracerebral y sus controles. Cada valor corresponde al promedio obtenido en 10 células por corte. Nótese que en la mayoría de datos comparados los valores son menores (mayor inmunorreactividad) en los infectados siendo estadísticamente significativo en ambas áreas. Lecturas realizadas mediante el programa *Image J*.

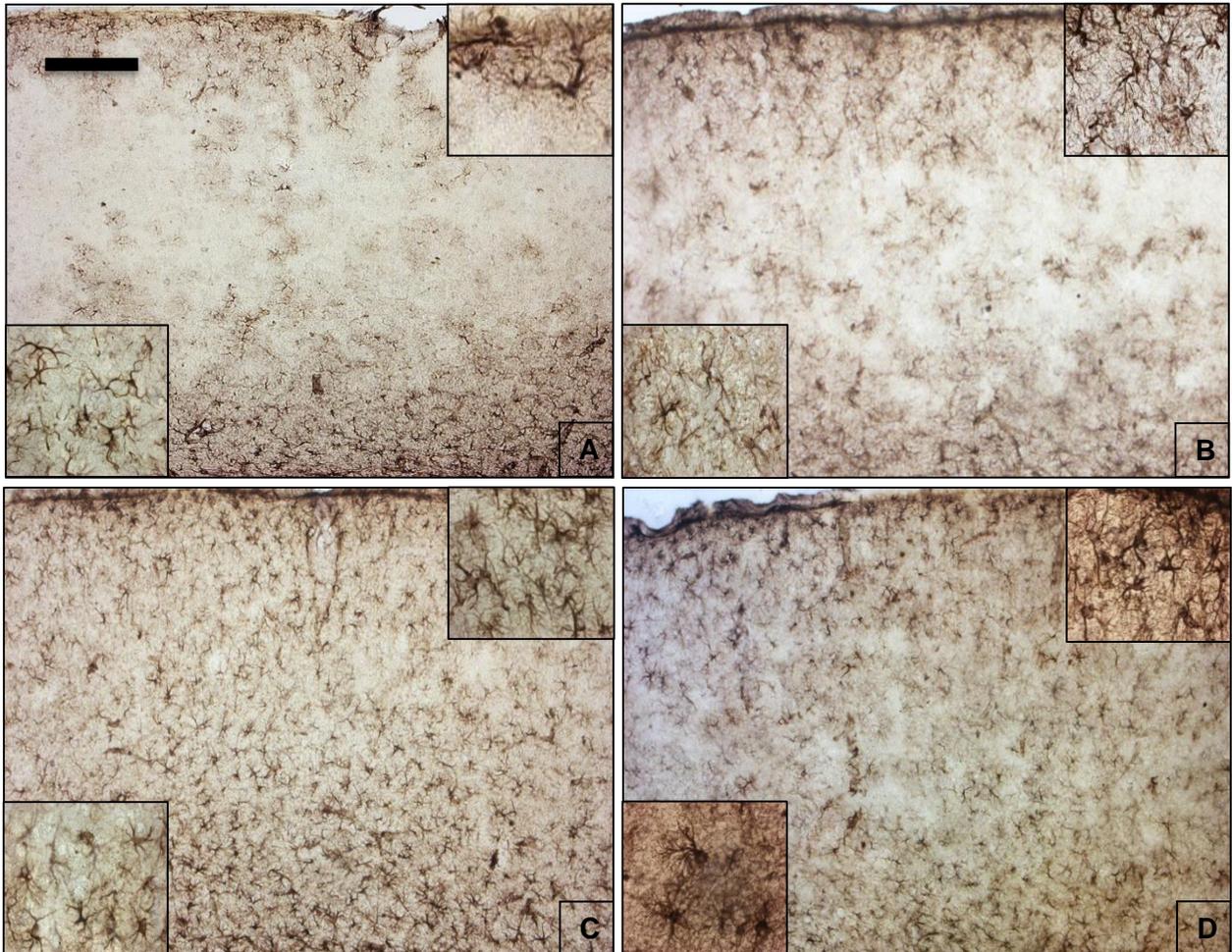
4.4 Inmunorreactividad a GFAP en astrocitos de animales doblemente inoculados

Los siguientes fueron los resultados obtenidos para la inmunohistoquímica de GFAP cuando los ratones fueron inoculados con el virus de la rabia inicialmente por vía intramuscular y 48 horas después por la ruta intracerebral. En los cortes obtenidos en vibrátomo se observó intensa inmunorreactividad a GFAP a través de todas las capas corticales. La imagen panorámica de los controles y los infectados fue distinta, se notó que hubo mayor aumento de células GFAP+ en los infectados con la doble inoculación (vía IM-IC) (Figura 4-7 A-D). Los conteos de células GFAP+ arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los infectados en la corteza motora anterior ($P < 0,017$) (Figura 4-7 E; Tabla 4-8) y en la corteza motora posterior ($P < 0,035$) (Figura 4-7 E; Tabla 4-9).

Al comparar el tamaño de las células GFAP+ medido sólo en los astrocitos que revelaban la morfología completa (cuerpo celular y sus procesos radiales) se halló diferencia significativa entre el área de los controles y los infectados ($74,2 \pm 14,3 \mu\text{m}^2$ vs $83,0 \pm 18,7 \mu\text{m}^2$) ($P < 0,0000$). Además, la infección generó mayor volumen del soma en los infectados ($399,4 \pm 141,2 \mu\text{m}^3$) con respecto a los controles ($338,8 \pm 103,3 \mu\text{m}^3$) ($P < 0,0000$) (Figura 4-8).

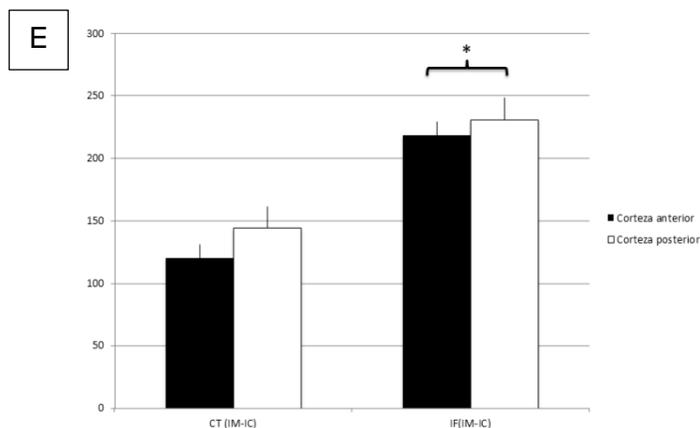
Por otra parte, hubo aumento de la inmunorreactividad a GFAP medida por densitometría óptica en los infectados. Hubo diferencias estadísticamente significativas en la inmunorreactividad a GFAP en la corteza anterior ($P < 0,020$) y la corteza posterior ($P < 0,004$) (Tabla 4-10).

Figura 4-7: Inmunohistoquímica de GFAP en corteza cerebral en cortes de vibrátomo corteza cerebral de ratones controles y ratones con rabia (doble inoculación intramuscular-intracerebral).



A y B. Corteza motora de ratones inoculados con solución vehículo por las dos vía de inoculación. **A.** Corteza anterior. **B.** Corteza posterior. **C y D.** Corteza motora de ratones inoculados con rabia por las dos vía de inoculación. La GFAP+ marca los astrocitos en todas las capas de la corteza motora en ambos casos. En los recuadros de cada imagen se detalla la morfología de los astrocitos (Imágenes en 10X y recuadros en 40X). Barra: 100um

Figura 4-7: (Continuación)



E. Diagramas que ilustran el resultado de los conteos de células inmunorreactivas a GFAP. Se encontró diferencias significativas al comparar controles (CT) con infectados (IF) en la corteza posterior (barras blancas), con respecto a la anterior (barras negras) (estadísticamente significativa).

Tabla 4-8. Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora anterior (inoculación intramuscular-intracerebral).

Capa	Muestra de controles			Promedio No. células por capa	Muestra de infectados			Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3		1	2	3		
I	41	54	51	48,67±3,93	95	66	70	77,00±15,0	0,072
II	3	3	4	3,33±0,33	16	18	23	19,00±2,08	0,015**
III	2	2	3	2,33±0,33	13	10	21	14,67±3,28	0,063
IV	3	2	2	2,33±0,33	14	11	16	13,67±1,45	0,013**
V	10	8	9	9,00±0,57	23	26	31	23,33±4,33	0,013**
VI	58	57	49	54,67±2,84	74	59	68	67,00±4,35	0,087
Totales	117	126	118	120,33±2,84	235	190	229	218,00±14,10	0,017**

** Estadísticamente significativo.

Datos del número de células inmunorreactivas para GFAP en las capas I-VI de la corteza anterior de ratones infectados con virus de la rabia por las dos vías de inoculación y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza, cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

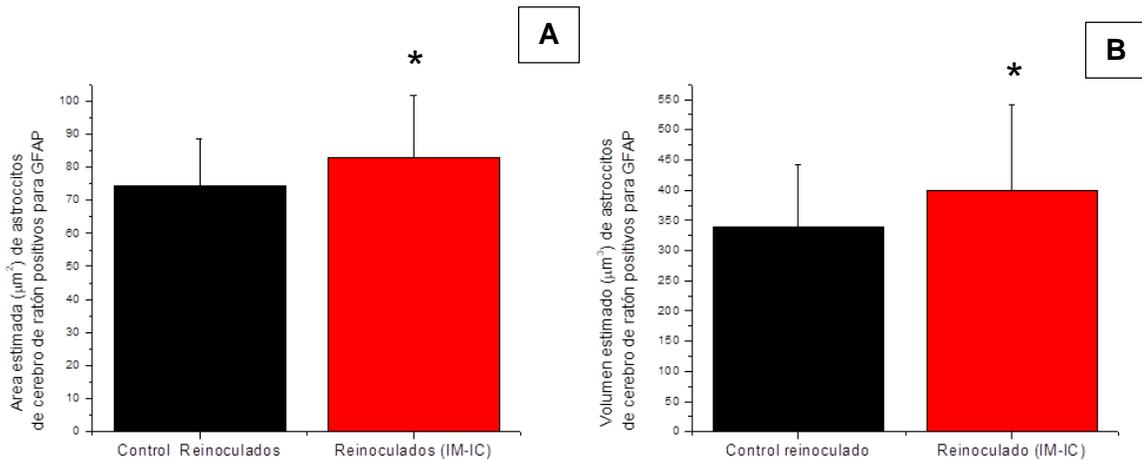
Tabla 4-9. Datos de los conteos de células GFAP+ en la corteza motora posterior (inoculación intramuscular-intracerebral).

Capa	Muestra de controles			Promedio No. células por capa	Muestra de infectados			Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3		1	2	3		
I	41	31	45	39,00±4,16	67	57	54	59,33±3,93	0.024**
II	5	2	4	3,67±0,88	8	15	15	12,67±2,33	0.047**
III	2	2	3	2,33±0,33	14	10	16	13,33±1,76	0.022**
IV	3	3	6	4,00±1,00	17	16	13	15,33±1,20	0.002**
V	12	5	13	10,00±2,51	43	27	32	34.00±4,72	0.020**
VI	84	79	91	84,67±3,48	120	71	102	97.67±14,31	0,462
Totales	147	122	162	143,67±11,66	269	195	231	231.67±21.36	0.035**

** Estadísticamente significativo.

Datos del número de células inmunorreactivas para GFAP en las capas I-VI de la corteza posterior de ratones infectados con virus de la rabia y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza, cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

Figura 4-8: Comparación del área y volumen del soma de las células positivas para GFAP (inoculación intramuscular-intracerebral).



Datos del tamaño expresado en área y volumen del cuerpo celular de los astrocitos inmunorreactivos a la proteína GFAP en la corteza cerebral de los controles y los infectados por las dos vías de inoculación. **A.** Comparación del área (en micrómetros cuadrados) del rectángulo mínimo que abarca a cada uno de los astrocitos. **B.** Comparación del volumen (en micrómetros cúbicos) del soma de los astrocitos. Las diferencias en área y volumen fueron estadísticamente significativas (n=200 células, P<0,0000).

Tabla 4-10. Densitometría óptica de la GFAP+ de la corteza cerebral de ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular-intracerebral).

Muestra	Corteza anterior		Corteza posterior	
	Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)	
	Controles	Infectados	Controles	Infectados
1	39,074±5,52	26,492±2,86	37,757±5,95	23,343±4,93
2	47,476±8,01	24,153±4,90	39,495±9,02	23,633±3,67
3	49,413±8,89	26,480±8,92	38,808±9,63	27,291±10,46
Promedio	45,321±5,49	25,708±1,34	38,686±0,87	24,755±1,27

** Estadísticamente significativo.

Datos correspondientes a las mediciones de transmitancia (luz transmitida) de la inmunotinción de GFAP en la corteza motora anterior y posterior de ratones inoculados por las dos vías (intramuscular-intracerebral) con el virus de la rabia y sus controles inoculados con solución vehículo. Cada valor corresponde al promedio obtenido en 10 células por corte. Nótese que en la mayoría de datos comparados los valores son menores (mayor inmunorreactividad) en los infectados siendo estadísticamente significativo en ambas áreas. Lecturas se realizaron mediante el programa *Image J*.

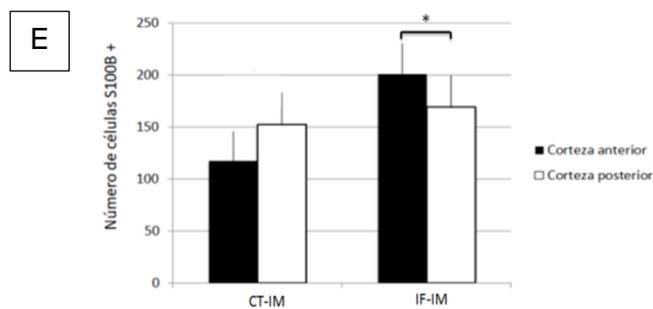
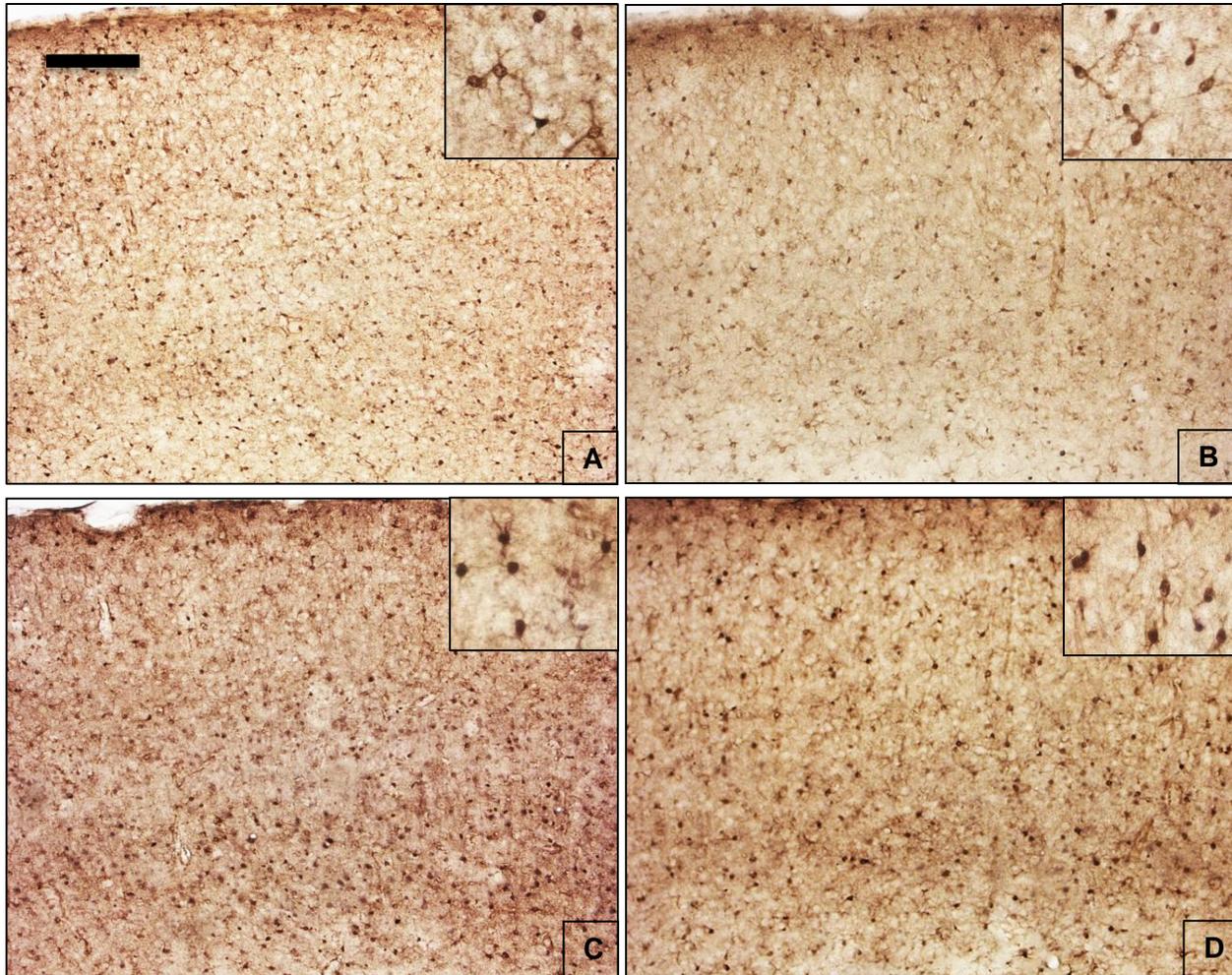
4.5 Distribución de astrocitos inmunorreactivos a S100B. Inoculación intramuscular.

En los cortes obtenidos en vibrátomo se observó intensa inmunorreactividad a S100B por todas las capas corticales. Las células positivas para el marcador se distribuyeron más o menos uniformemente. Al comparar la imagen panorámica de los controles y los infectados se notó que hubo incremento de células S100B+ en los infectados (Figura 4-9 A-D). Los conteos de células S100B inmunopositivas arrojaron diferencias estadísticamente significativas en la corteza motora anterior ($P < 0,015$) (Figura 4-9 E; Tabla 4-11) y en la corteza motora posterior ($P < 0,012$) (Figura 4-9 E; Tabla 4-12).

Igualmente, al comparar el tamaño de las células S100B medido (área y volumen) sólo en los astrocitos que revelaban la morfología completa (cuerpo celular y sus procesos radiales) se halló diferencia estadísticamente significativa: fue mayor en los ratones infectados ($79,8 \pm 18,7 \mu\text{m}^2$ y $376,2 \pm 136,4 \mu\text{m}^3$) en comparación con los ratones controles ($74,5 \pm 21,3 \mu\text{m}^2$ y $345,5 \pm 153,4 \mu\text{m}^3$) ($P < 0,0008$) (Figura 4-10).

Por otra parte, hubo aumento de la inmunorreactividad a S100B medida por densitometría óptica en los infectados. Las diferencias fueron estadísticamente significativas en la inmunorreactividad a S100B, tanto en la corteza anterior ($P < 0,000$), como en la corteza posterior ($P < 0,012$) (Tabla 4-13).

Figura 4-9: Células astrogliales marcadas con la proteína S100B en la corteza cerebral de ratón (inoculación intramuscular).



A y B. Corteza motora de ratones controles. **A.** Corteza anterior. **B.** Corteza posterior. **C y D.** Corteza motora de ratones inoculados con rabia por vía intramuscular. La S100B marca los astrocitos en todas las capas corticales. En los recuadros se detalla la morfología de los astrocitos (Imágenes en 10X y recuadros en 40X). **E.** Diagrama de los conteos de células inmunorreactivas a S-100B. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar controles (CT) con infectados (IF) en la corteza anterior (barras negras) y corteza posterior (barras blancas). El número de células S100B+ fue siempre mayor en los infectados. Barra: 100um

Tabla 4-11. Datos de los conteos de células S100B+ en la corteza motora anterior

Capa	Muestra de controles					Promedio No. células por capa	Muestra de infectados					Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
I	56	68	95	50	45	62,8 ± 8,91	75	69	87	65	54	70,0 ± 5,45	0,514
II	44	39	49	38	26	39,2 ± 3,83	56	49	64	42	38	49,8 ± 4,69	0,120
III	37	38	45	39	35	38,8 ± 1,68	52	54	51	40	42	47,8 ± 2,83	0,032**
IV	32	39	35	40	38	36,8 ± 1,46	49	50	62	46	56	52,6 ± 2,85	0,003**
V	196	186	155	158	151	169,2 ± 9,10	226	195	221	254	216	222,4 ± 9,50	0,004**
VI	212	216	241	244	218	226,2 ± 6,74	317	197	324	355	239	286,4 ± 29,4	0,110
Totales	577	586	620	567	513	572,6 ± 17,36	776	615	808	801	645	729,0 ± 41,04	0,015**

**Estadísticamente significativo

Datos del número de células inmunorreactivas para S100B en las capas I-VI de la corteza anterior de ratones infectados con virus de la rabia y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza, cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

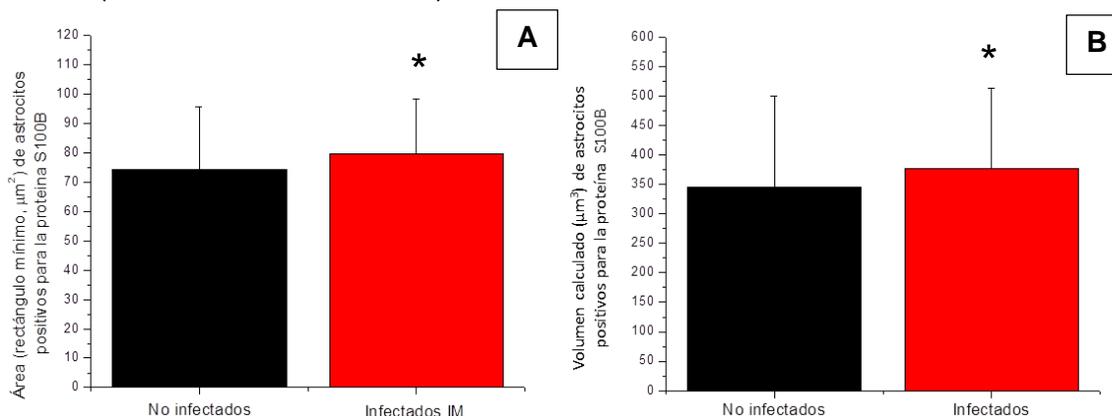
Tabla 4-12. Datos de los conteos de células S100B+ en la corteza motora posterior

Capa	Muestra de controles					Promedio No. células por capa	Muestra de infectados					Promedio No. células por capa	P valor
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		
I	46	49	44	39	49	45,4 ± 1,8	39	64	61	44	53	52,2 ± 4,79	0,241
II	35	39	28	31	34	33,4 ± 1,8	42	49	49	37	45	44,4 ± 2,27	0,006**
III	26	32	32	31	30	30,2 ± 1,1	44	44	43	38	40	41,8 ± 1,20	0,000**
IV	37	44	30	29	43	36,6 ± 3,1	52	57	47	44	47	49,4 ± 2,29	0,012**
V	127	124	98	124	120	118,6 ± 5,2	288	254	242	160	176	224,0 ± 24,20	0,011**
VI	80	80	73	67	82	76,4 ± 2,8	253	130	195	97	112	157,4 ± 29,16	0,050**
Totales	351	368	304	321	358	340,4 ± 12,01	718	596	637	420	473	568,8 ± 54,30	0,012**

**Estadísticamente significativo

Datos del número de células inmunorreactivas para S100B en las capas I-VI de la corteza posterior de ratones infectados con virus de la rabia y sus respectivos controles. Por cada muestra se relacionan el número total de células por 1,3 mm² de corteza, cada dato en las capas corresponde al promedio de 4 conteos realizados por dos observadores (dos por observador).

Figura 4-10: Comparación del área y el volumen del soma de las células positivas para S100B (inoculación intramuscular).



Datos del tamaño expresado en área y volumen del cuerpo celular de los astrocitos inmunorreactivos a la proteína S100B en la corteza cerebral de los controles y los infectados por la vía intramuscular. **A.** Comparación del área (en micrómetros cuadrados) del rectángulo mínimo que abarca a cada uno de los astrocitos. **B.** Comparación del volumen (en micrómetros cúbicos) del soma de los astrocitos. Las diferencias en área y volumen fueron estadísticamente significativas ($n=200$ células, $P<0,0008$).

Tabla 4-13. Densitometría óptica de la S100B+ de la corteza cerebral anterior en ratones controles y ratones con rabia (inoculación intramuscular).

Muestra	Corteza anterior		P valor	Corteza posterior		P valor
	Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)			Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
	Controles	Infectados		Controles	Infectados	
1	59,582 ± 5,08	36,702 ± 5,87	0,000**	45,323 ± 6,21	33,732 ± 4,50	0,012**
2	62,342 ± 7,05	49,438 ± 6,92		62,406 ± 9,10	32,384 ± 3,73	
3	61,051 ± 3,31	33,078 ± 5,55		76,486 ± 4,09	38,742 ± 1,78	
4	66,704 ± 5,56	35,078 ± 4,93		50,709 ± 2,93	38,051 ± 1,40	
5	62,548 ± 8,00	39,064 ± 3,21		58,799 ± 10,87	37,356 ± 6,11	
Promedio	62,446 ± 2,65	38,672 ± 6,40		58,744 ± 11,96	36,053 ± 2,81	

**Estadísticamente significativo

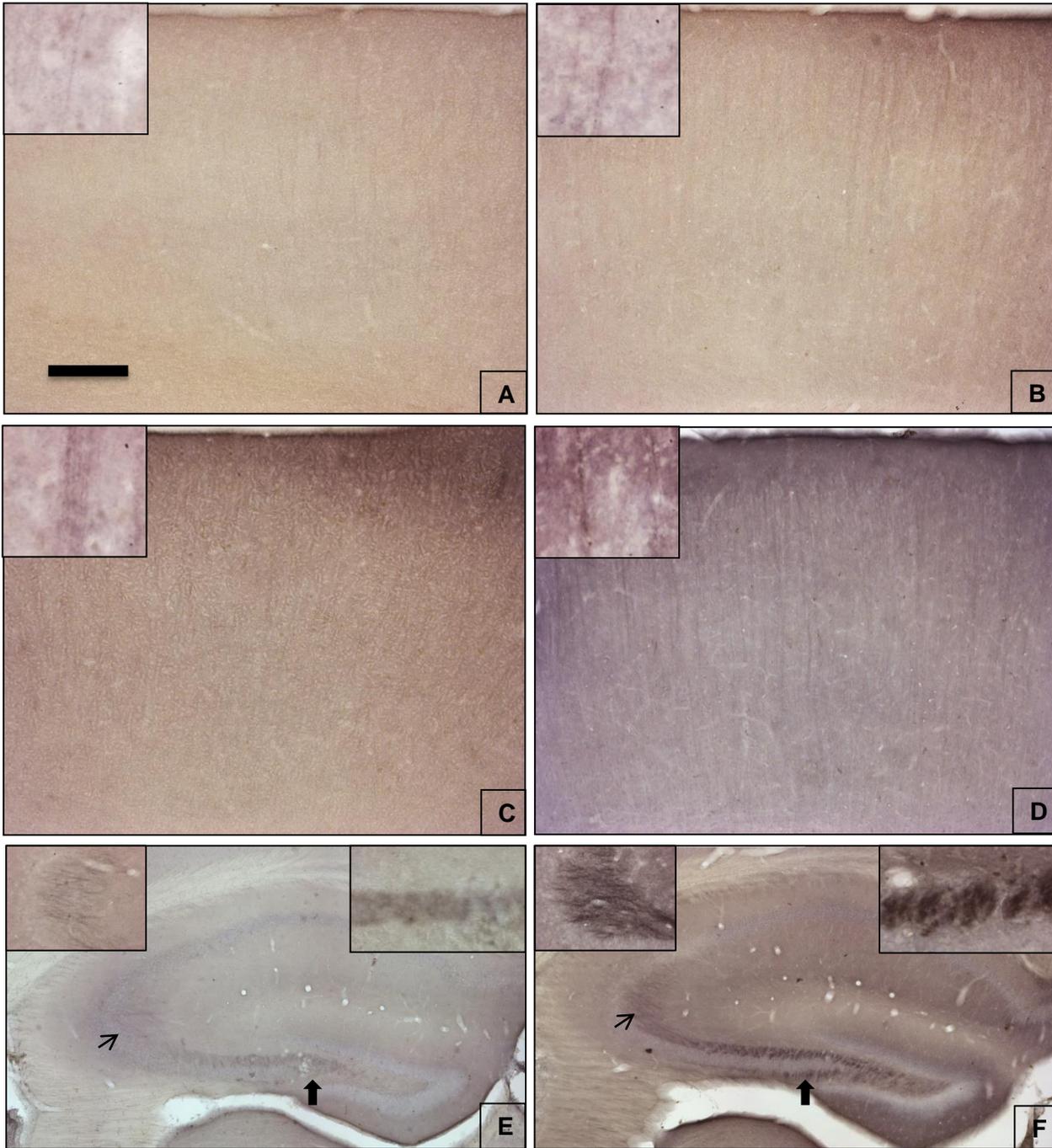
Datos correspondientes a las mediciones de transmitancia (luz transmitida) de la inmunotinción de S100B en la corteza motora anterior y posterior de ratones inoculados con virus de la rabia por vía intramuscular y sus controles. Cada valor corresponde al promedio obtenido en 10 células por corte. Nótese que en la mayoría de datos comparados los valores son menores (mayor inmunorreactividad) en los infectados. Las diferencias fueron estadísticamente significativas en ambas áreas. Las lecturas se realizaron mediante el programa *Image J*.

4.6 Inmunorreactividad de vimentina en la corteza y el hipocampo. Inoculación intramuscular.

A diferencia de los marcadores anteriores (GFAP y S100B), la inmunorreactividad a vimentina no se observó en células. En la corteza motora tanto anterior como posterior la inmunotinción de la vimentina se manifestó en forma de largas y finas fibras radiales, sobresaliendo de un fondo difuso, con mayor intensidad hacia las capas supragranulares (capas I, II, III) y en la corteza motora posterior (Figura 4-11 A-D).

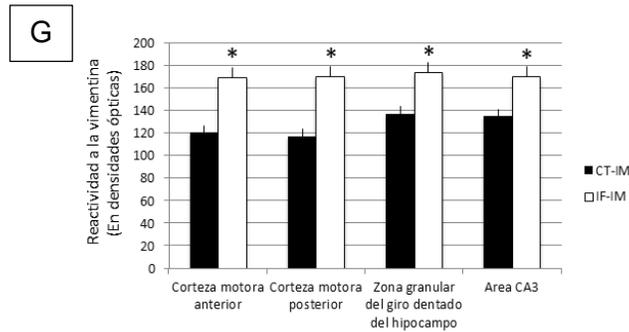
También se observó inmunorreactividad intensa en el estrato polimórfico del giro dentado y el área CA3 del hipocampo. Allí la marcación se localizó en grupos de fibras cortas y densamente agrupadas (Figura 4-11 E-F). En todas las áreas corticales y de la formación hipocampal que mostraron inmunorreactividad a vimentina la infección con el virus de la rabia generó aumento estadísticamente significativo en la expresión de la proteína cuantificada mediante densitometría óptica (Figura 4-11 G y Tabla 4-14).

Figura 4-11: Inmunorreactividad a vimentina en la corteza cerebral e hipocampo de ratón (inoculación intramuscular).



A y B. Corteza motora de ratones controles. **A** Corteza anterior. **B.** Corteza posterior. **C y D.** Corteza motora de ratones inoculados con virus de la rabia por vía intramuscular. **C.** Corteza anterior. **D.** Corteza posterior. Se aprecia mayor inmunotinción con aspecto de glía radial en los infectados. **E.** Hipocampo de un control. **F.** Hipocampo de un infectado. La infección intensificó la inmunorreactividad en lo que aparentemente es glía radial de la región CA3 del hipocampo (flecha delgada y recuadro superior izquierdo) y en la capa polimórfica del giro dentado (flecha gruesa y recuadro superior derecho). (Imágenes en 10X y recuadros ampliados en 40X). Barra: 100µm

Figura 4-11: (Continuación)



G. Histograma que ilustra las diferencias en inmunorreactividad a vimentina, medida mediante densitometría óptica, en cuatro zonas del encéfalo en ratones controles (barras negras) y ratones infectados con rabia por vía intramuscular (barras blancas) con el virus de la rabia.

Tabla 4-14. Datos de densitometría óptica de vimentina en la corteza motora y el hipocampo de ratones controles y ratones con rabia (ruta intramuscular).

Área	MUESTRAS CONTROL						MUESTRAS INFECTADAS						P valor
	Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)						Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)						
	1	2	3	4	5	Promedio	1	2	3	4	5	Promedio	
1°	136,926 ±2,10	136,584 ±1,60	133,886 ±13,93	126,743 ±13,28	139,675 ±3,84	134,763 ±4,92	86,798 ±3,82	76,810 ±11,18	91,845 ±5,43	96,322 ±1,61	81,084 ±20,48	86,572 ±7,87	0,000**
2°	140,771 ±5,43	143,939 ±8,18	134,333 ±4,70	132,348 ±12,9	141,901 ±12,99	138,514 ±5,26	90,643 ±5,71	89,107 ±7,51	85,265 ±10,55	77,326 ±13,29	86,688 ±6,48	86,472 ±6,09	0,000**
3°	108,961 ±5,40	111,641 ±5,20	116,802 ±3,26	124,049 ±6,65	133,566 ±1,49	119,004 ±9,96	73,974 ±9,26	94,291 ±2,34	96,001 ±3,75	61,691 ±2,07	83,751 ±7,23	81,942 ±14,37	0,002**
4°	120,498 ±4,78	126,903 ±4,73	127,595 ±10,07	115,439 ±9,40	116,912 ±2,37	121,469 ±5,59	96,604 ±16,52	80,108 ±7,91	73,875 ±8,87	99,755 ±5,90	87,331 ±1,56	87,535 ±10,87	0,001**

**Estadísticamente significativo

Datos correspondientes a las mediciones de transmitancia (densitometría óptica) de la inmunotinción de vimentina en cuatro áreas encefálicas. 1°: Corteza motora anterior; 2°: Corteza motora posterior; 3°: Capa polimórfica del giro dentado del hipocampo; 4°: Zona CA3 del hipocampo.

4.7 Estudio ultraestructural convencional

El propósito principal del estudio ultraestructural fue el de buscar partículas virales o inclusiones de ribonucleoproteína viral dentro de los astrocitos y eventualmente en alguna de las otras células gliales que se observaran. El área de observación fue la corteza cerebral motora en plano coronal. Las células gliales más frecuentemente observadas fueron los astrocitos y un escaso número de oligodendrocitos. Los astrocitos en el microscopio electrónico se distinguen fácilmente de las neuronas por las características de su núcleo y su menor tamaño. El citoplasma de los astrocitos así como su membrana celular son difíciles de distinguir del neuropilo circundante.

Todos los astrocitos observados correspondieron al tipo protoplasmático que se caracterizan por tener un núcleo redondo, mucho más oscuro y pequeño que el de una neurona y con manchas de cromatina dispersas, con tendencia a desplazarse hacia la periferia en contacto con la membrana celular (Figuras 4-12 y 4-13). Para ilustrar la ultraestructura de los astrocitos fibrosos se incluye una imagen tomada en la sustancia blanca de la médula espinal. El astrocito fibroso presenta un núcleo de contorno más irregular y alargado (Figura 4-14).

Se tomaron imágenes de un total de 50 astrocitos en muestras tomadas de tres ratones infectados con el virus de la rabia. En ninguna de ellas se observaron partículas virales ni inclusiones de ribonucleoproteína viral como las observadas en las neuronas (Figuras 4-15). Tampoco se observaron alteraciones ultraestructurales en los astrocitos de las muestras infectadas en comparación con los controles. Por otra parte, fue escaso el número de oligodendrocitos observados en el microscopio electrónico dentro del área correspondiente a la corteza cerebral motora. Estos se caracterizan por poseer un citoplasma oscuro o denso que sí se distingue fácilmente del neuropilo vecino. Además su tamaño es menor al de un astrocito (Figura 4-16).

Figura 4-12: Ultraestructura de un astrocito de la corteza cerebral de ratón.

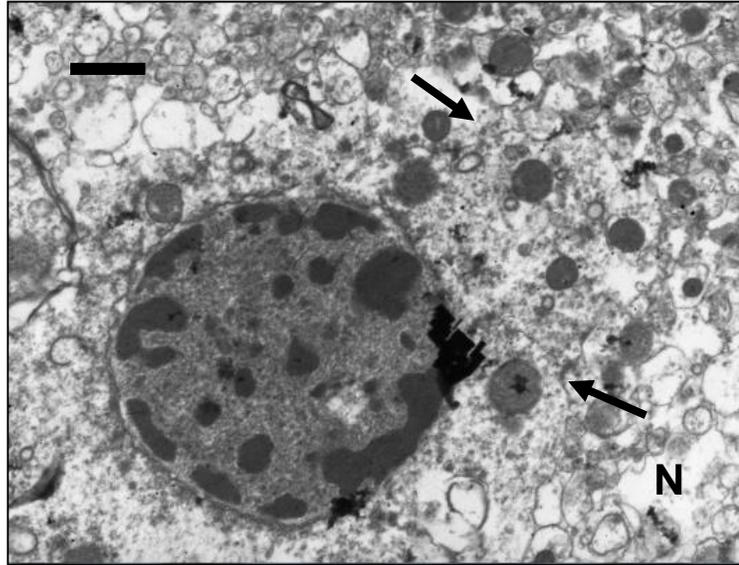
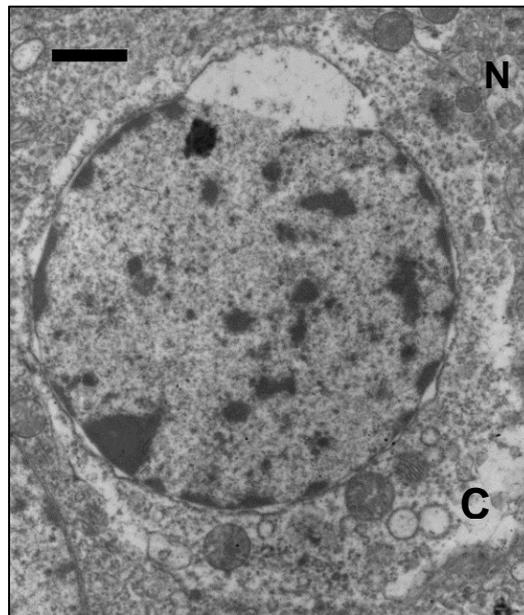


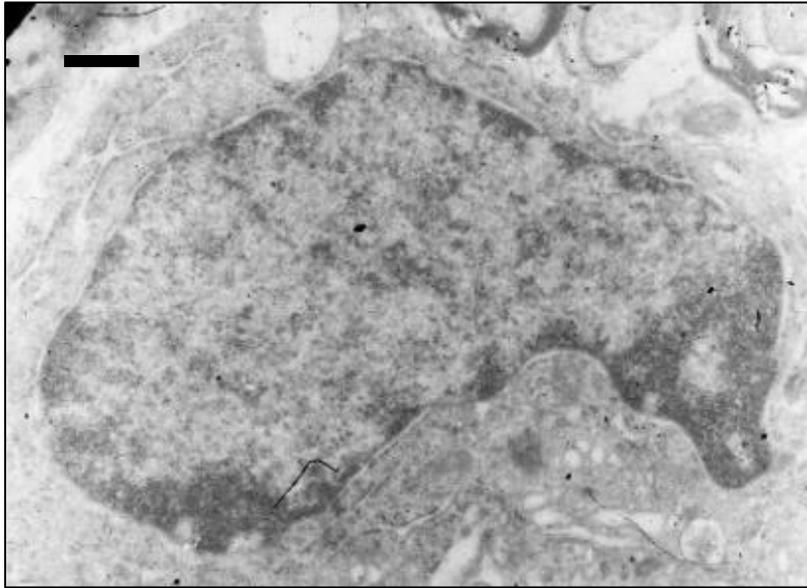
Imagen en el microscopio electrónico de un astrocito protoplasmático de la corteza cerebral de un ratón infectado con virus de la rabia. El núcleo es electrodenso y con abundantes masas de cromatina. La membrana celular (flechas) es difícil de distinguir del neuropilo circundante (N). No se observaron partículas virales dentro de los astrocitos. Barra = 1,2 μ m

Figura 4-13: Ultraestructura de un astrocito de la corteza cerebral de ratón.



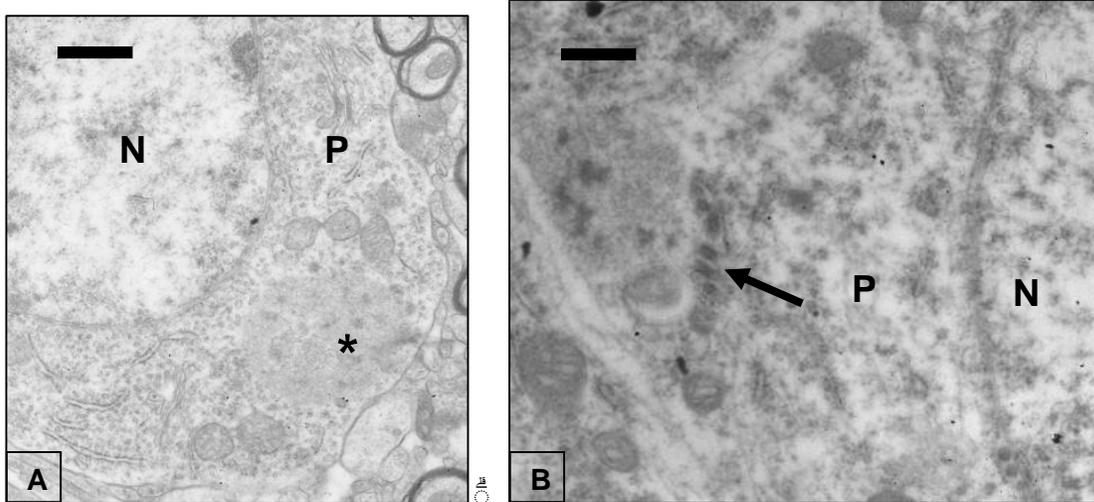
Electromicrografía de un astrocito protoplasmático de la corteza cerebral de un ratón infectado con virus de la rabia. La muestra se procesó después de 12 horas postmortem. Esto permitió distinguir el citoplasma del astrocito (C) que muestra una mayor degradación que el neuropilo circundante (N). En estas muestras tampoco se observaron partículas virales. Barra = 1,0 μ m

Figura 4-14: Ultraestructura de un astrocito fibroso de la médula espinal de ratón.



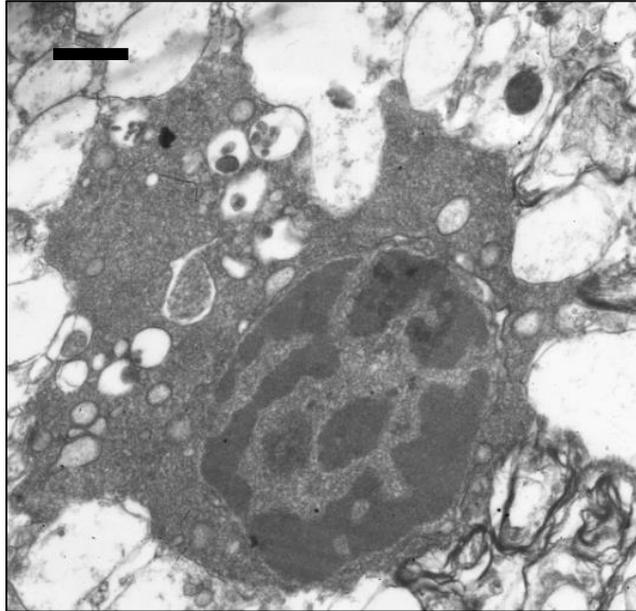
Electromicrografía de un astrocito fibroso de la sustancia blanca de la médula espinal de un ratón infectado con virus de la rabia. El núcleo es alargado y de contorno irregular. No se observaron partículas virales en estas células. Barra = 0.5 μm

Figura 4-15. Ultraestructura de neuronas infectadas con virus de la rabia.



A. Imagen ultraestructural de parte de una neurona que muestra el núcleo pálido (N) con escasa cromatina y una inclusión de ribonucleoproteína viral (asterisco) dentro del pericarion (P = citoplasma). Barra = 0.7 μm . **B.** Imagen del fragmento de una neurona que contiene algunas partículas del virus de la rabia dentro del pericarion (flecha). Barra = 0.4 μm .

Figura 4-16. Ultraestructura de un oligodendrocito en la corteza cerebral de ratón.



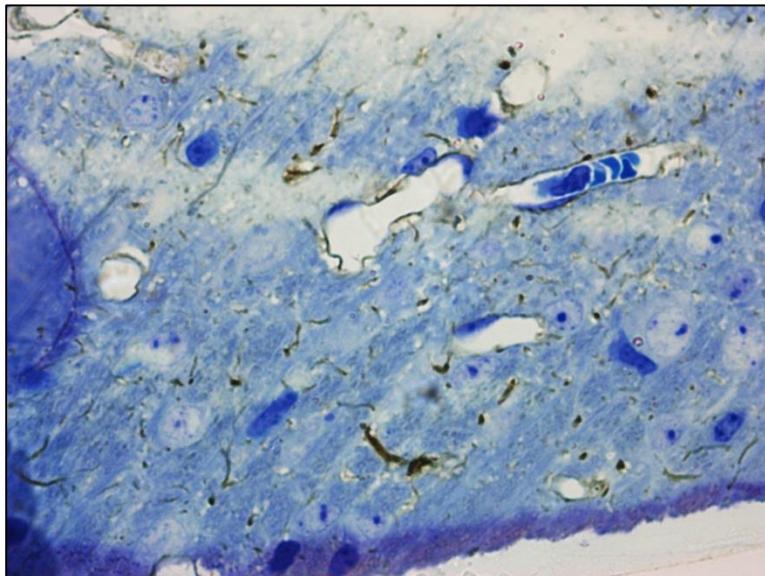
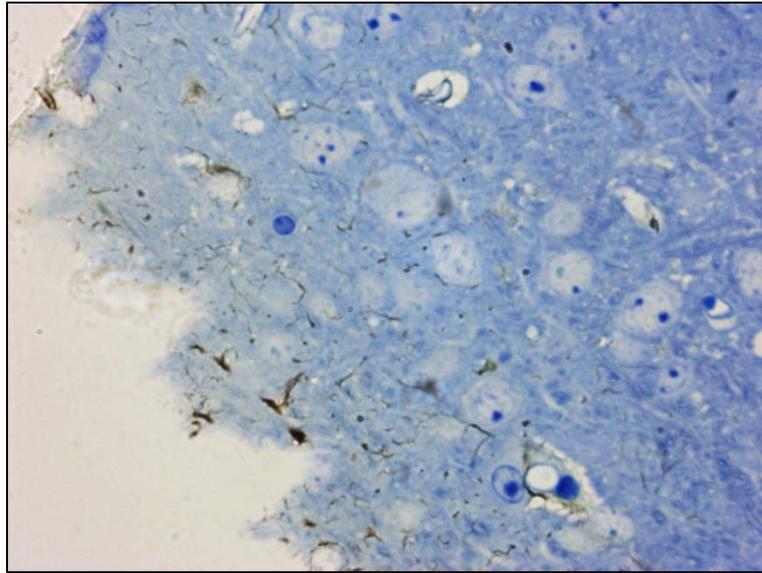
Fotografía de un oligodendrocito de la corteza cerebral de un ratón infectado con el virus de la rabia tomada en el microscopio electrónico. Estas células gliales se distinguen por su citoplasma generalmente más oscuro que el de las neuronas y otras células gliales. En estas células tampoco se observaron partículas virales. Barra = 0.85 μm .

4.8 Inmunomicroscopía electrónica

Para asegurar una búsqueda de partículas virales en células con la certeza absoluta de ser astrocitos, se procesaron muestras con la técnica de “inmunomicroscopía electrónica” pre-imbibición. Como se describió en la sección de materiales y métodos se obtuvieron cortes en vibrátomo de 100 micrómetros de espesor y luego estos se procesaron para inmunohistoquímica de GFAP. A continuación ese material se procesó para microscopía electrónica. En los cortes semifinos (cortes de menos de 1 μm de espesor obtenidos en ultramicrotomo) coloreados con azul de toluidina, las áreas inmunorreactivas a GFAP se observaron de color dorado producto de la inmunotinción con la diaminobencidina (Figura 4-17). En el microscopio electrónico se pudo comprobar que esta marcación se localizó en el citoplasma de los astrocitos. Allí se observó como un material granulado electrodensito producto de la reacción de la diaminobencidina con el tetróxido de osmio (Figura 4-18). Con frecuencia se observaron sólo fragmentos de ellos, por ejemplo, pies de astrocitos alrededor de capilares sanguíneos (Figura 4-19). En mayor aumento no se observaron

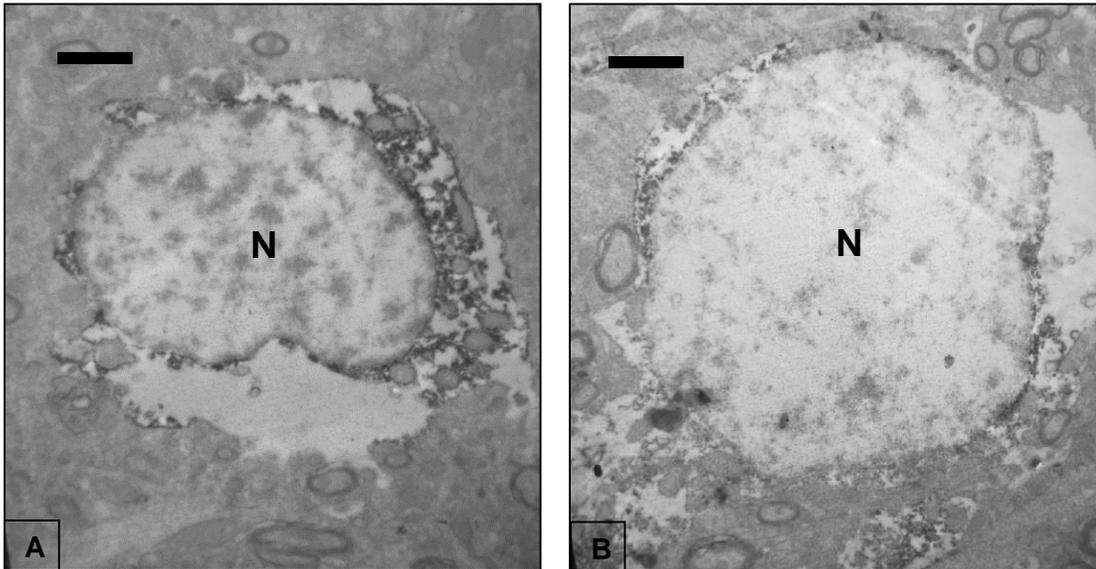
partículas virales dentro del citoplasma de los astrocitos marcados en más de 50 células o fragmentos de células fotografiados.

Figura 4-17: Cortes semifinos de corteza cerebral coloreados con azul de toluidina.



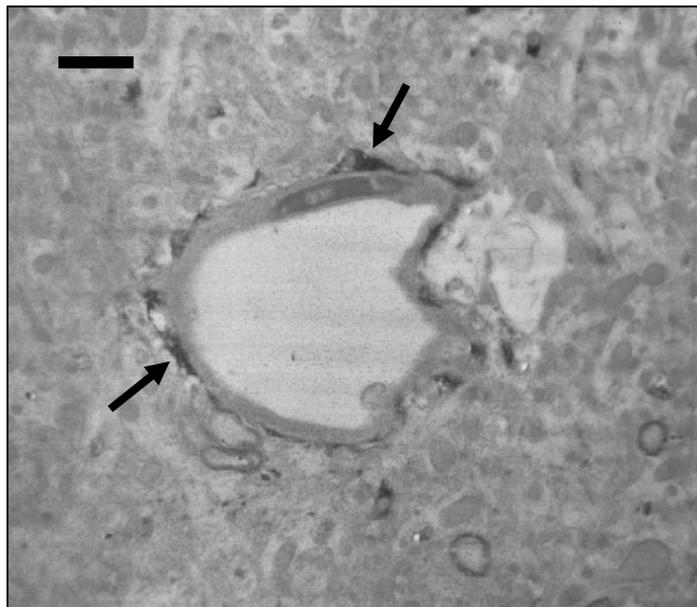
Cortes semifinos (700 nm de espesor) obtenidos a partir de la corteza cerebral de un ratón inoculado con virus de la rabia procesado mediante inmunomicroscopía para GFAP. La inmunorreactividad a GFAP se resalta por el color dorado oscuro producto de la inmunotinción con diaminobencidina. Es notable la marcación alrededor de los vasos sanguíneos. Coloración azul de toluidina. 40X

Figura 4-18: Ultraestructura de astrocitos inmunorreactivos a GFAP en corteza de ratón.



Imágenes de astrocitos obtenidas mediante inmunomicroscopía electrónica con GFAP. El núcleo (N) es más pálido (no inmunorreactivo) y ocupa gran parte del área de la célula. Alrededor se nota el citoplasma que contiene material granular oscuro producto de la reacción entre el tetróxido de osmio y la diaminobencidina. En mayor aumento no se observaron partículas virales dentro del citoplasma de ninguna de las células marcadas. A, Barra = 1,2 μm ; B, Barra = 1,0 μm .

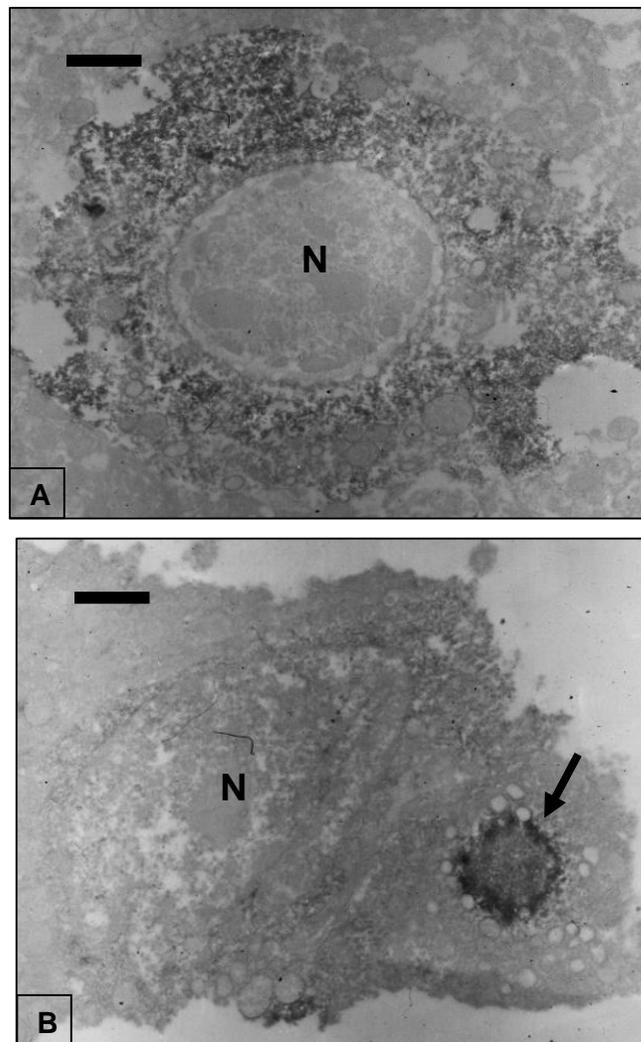
Figura 4-19: Micrografía electrónica de pies de astrocitos marcados con GFAP.



Micrografía electrónica de un capilar sanguíneo delimitado por una célula endotelial. Alrededor se notan pies de astrocitos inmunorreactivos a GFAP. En mayor aumento no se observaron partículas virales dentro de los pies de los astrocitos. Barra = 1,2 μm .

En un segundo estudio de inmunomicroscopía electrónica se procesaron cortes (100 μm) para inmunohistoquímica con anticuerpo antirrábico. Luego estos se procesaron para microscopía electrónica. La ultraestructura reveló la presencia de antígenos virales en el citoplasma neuronal, incluyendo cuerpos de Negri (Figura 4-20) pero no en células gliales. Los cuerpos de Negri son la característica patognomónica de la rabia. Están formados principalmente por ribonucleoproteína viral y pueden contener algunos viriones.

Figura 4-20: Inmunomicroscopía electrónica de neuronas inmunorreactivas a rabia en corteza cerebral de ratón.



A. Imagen de una neurona que muestra antígenos rábicos dispersos a través del pericarion mientras que no hay inmunorreactividad en el núcleo (N). Barra = 1,3 μm . **B.** Imagen de una neurona que contiene un cuerpo de Negri con intensa inmunorreactividad (flecha). Barra = 1,2 μm .

5. Discusión

5.1 Breve análisis

El virus de la rabia es neurotrópico y la investigación celular se ha enfocado en las neuronas, casi ignorando a la glía. Esto se debe a que las partículas virales y los cuerpos de Negri (el rasgo patognomónico de la rabia) se encuentran sólo en el citoplasma neuronal; rara vez se han hallado partículas virales en células gliales. Además las descripciones histopatológicas convencionales reportan escasa reacción glial en rabia (2,29,101,104). Aquí se estudió del efecto de la infección en los astrocitos, las células más numerosas del sistema nervioso y las células gliales más estrechamente relacionadas con las neuronas (10,17,18,41,43). Se evaluó la inmunorreactividad de tres proteínas características de los astrocitos (GFAP, S100B y vimentina), que generalmente se sobreexpresan en condiciones patológicas (66,81,83,91,183). Adicionalmente, con el microscopio electrónico se realizó la búsqueda del virus o algún efecto ultraestructural de la infección en los astrocitos. Los resultados confirman el carácter 'neurotrópico' del virus de la rabia y la poca reactividad de los astrocitos a esta infección en condiciones experimentales similares a las de la infección natural (inoculación intramuscular - IM). Además de la ausencia de virus y los escasos cambios citomorfológicos observados en los astrocitos, la GFAP y la vimentina, dos proteínas de filamento intermedio, apenas exhibieron una reacción moderada en la astrogliá a diferencia de lo que se conoce en otras infecciones del sistema nervioso (74,149,185). Sólo la S100B, una proteína de enlace del calcio, se sobreexpresó notablemente en los astrocitos. Esta respuesta coincide con otros estudios en donde se ha reportado efecto de la infección con el virus de la rabia en la inmunorreactividad de proteínas de unión a calcio en las neuronas (117,127,131). Si bien fue posible inducir reacción astrogliá significativa cuando el virus se inoculó por ruta intracerebral (IC) se debe tener en cuenta que esa no es la vía natural de infección.

5.2 Inmunorreactividad de astrocitos a GFAP

La proteína GFAP se puede detectar por inmunohistoquímica en los procesos citoplasmáticos que emergen del cuerpo celular de los astrocitos; no se encuentra en todo el citoplasma de estas células (65). En este trabajo estudiamos la respuesta citomorfológica de los astrocitos a la infección con el virus de la rabia mediante la evaluación de la inmunorreactividad de la proteína acida fibrilar de la glía (GFAP) y se evidenció que solo hubo diferencia estadísticamente significativa en la corteza cerebral de los animales infectados por vía IC y los sometidos a doble inoculación (IM seguida de IC). En estos últimos también se encontró mayor número de células reactivas en las diferentes capas de la corteza motora posterior. Aunque en este trabajo no discriminamos qué tipo de astrocitos están más comprometidos, la localización de la reactividad de la GFAP sugiere que tanto los astrocitos fibrosos como los protoplasmáticos pueden estar implicados en la respuesta a la infección. Estos resultados se pueden relacionar con los hallazgos publicados por Zlonik en 1968 (cuando aún no se había descubierto la GFAP). Mediante una técnica histológica observó distintos grados de proliferación e hipertrofia en los astrocitos después reinoculaciones intracerebrales sucesivas con virus de rabia (108).

Por otra parte, Miyake et al. en 1988 realizaron pinchazos con una aguja en el encéfalo de ratones ICR de tres meses de edad y estos presentaron aumento de la inmunorreactividad para GFAP en astrocitos de la capa molecular (capas I) y en las capas medias y profundas (II-VI) entre 24 a 96 horas. En la capa I, no hubo un cambio significativo en el número de astrocitos positivos para GFAP alrededor de la herida, sugiriendo que la capa I tiene pocas células que pueden convertirse en astrocitos reactivos sin proliferación (144). Estos trabajos sugieren que los astrocitos protoplasmáticos, en respuesta a una lesión cerebral inducida por virus rábico, se vuelven intensamente GFAP-inmunorreactivos, reacción que podría ser secundaria a una mayor concentración de filamentos GFAP que genera hipertrofia de los astrocitos (80).

La posibilidad de una hipertrofia de los astrocitos también se apoya en el hallazgo del aparente incremento en el diámetro, área y volumen en respuesta a la infección lo cual es consistente con una astrogliosis reactiva, similar a la observada en la encefalomiелitis ligada al virus de la rabia. Otros trabajos han sugerido una proliferación de los astrocitos

reactivos no infectados (17) y en experimentos con animales transgénicos se muestra que la expresión de la GFAP es indispensable en los procesos de reacción astrogliar y la formación de cicatriz glial (145). Estos resultados permiten proponer que en la patogénesis de la rabia hay una reacción glial (astroglisis reactiva) que puede ser leve o moderada.

La astroglisis reactiva leve o moderada se presenta por lo general por un trauma leve, infecciones virales o bacterianas y en áreas que están a cierta distancia de las lesiones del SNC (81,145). Por otro lado, los pies terminales del astrocito unidos a los capilares que se observan en el tejido sano, se vuelven hipertróficos durante un proceso de encefalitis lo que permite la circulación de linfocitos y otras células inflamatorias en el parénquima del SNC (146). Los astrocitos reactivos son prominentes en casi todos los tipos de encefalitis viral como las causadas por el virus del herpes, inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y T-linfotrópico tipo 1 humano (147,148).

En otras infecciones virales que afectan al SNC pero provienen de tejidos periféricos, los patógenos ingresan al sistema nervioso periférico (SNP) y al SNC ya sea por infección directa de las terminaciones nerviosas en los tejidos, o por infectar células del sistema circulatorio que finalmente llevan la infección a través de la BHE hacia el SNC (149). En el caso del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) este se dirige principalmente a los linfocitos T CD4+, además puede infectar a los macrófagos/microglia, que funcionan como células que fagocitan y presentan los antígenos al SNC, y a los astrocitos, que expresan el receptor de la superficie celular CD4 (150).

Otro ejemplo es el virus de la hepatitis C (VHC) que está asociado con anomalías del SNC tales como disfunción cognitiva, fatiga y depresión (151). La infección del SNC por el VHC también se asocia con una mayor expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-12 e IL18), colina, creatina e inositol, las cuales desencadenan la activación microglia y astrocitos, dando lugar a trastornos neurológicos pronunciados (151). La subfamilia del virus del herpes beta, citomegalovirus congénito (HCMV), un virus de linaje mieloide, puede infectar astrocitos, pericitos, neuronas, células microgliales, y células madre neuronales. Los astrocitos y las células microgliales producen citoquinas inflamatorias en respuesta a la infección por HCMV y esta respuesta puede promover enfermedades del desarrollo neurológico fetal (152).

Una posibilidad de la respuesta reactiva astrogliar se podría presentar por daño mecánico del tejido cerebral durante la inoculación, sin embargo, la reacción también la observamos en el hemisferio contralateral. Esta misma observación fue descrita por Zlonik a partir de las 12 horas p.i. Además describe que los astrocitos mostraron un incremento en el tamaño así como hinchamiento y proliferación del endotelio capilar. Los astrocitos que estaban alrededor de las neuronas se hallaron hipertrofiados con muchas proyecciones fibrosas. Algunos astrocitos hipertrofiados parecían ser 4-5 veces más grandes que los astrocitos normales en los animales controles (108).

Se conoce que en las enfermedades virales agudas, los astrocitos se activan muy pronto después de la infección y que se pueden observar cambios en los astrocitos antes de que otros elementos del SNC se vean afectados. Hamir en el 2011 observó en un hurón inoculado con una variante del virus de la rabia por vía IM proliferación de astrocitos en el cerebelo (153). En nuestro estudio, no hubo manifestación de reacción astrogliar en los animales inoculados por la vía IM, sin embargo, la severa proliferación e hipertrofia de los astrocitos vistos después de la reinoculación IC sugiere que la reacción glial se desencadena en parte por la acción de complejos virus-anticuerpo y que la hipertrofia de los astrocitos puede depender de la especie y la progresión de la gliosis en el cerebro se puede dar tiempo después de que el virus pueda ser aislado en respuesta a la infección con el virus de la rabia (108).

Nosotros no pudimos establecer en este trabajo si los cambios en los filamentos que están constituidos principalmente por la proteína GFAP son más notorios en los astrocitos protoplasmáticos o fibrosos. No obstante, en el estudio de Kojima (2010), realizado en 24 ratones BALB/c de seis semanas de edad con virus rábico CVS inoculado por vía IC se halló que la GFAP se incrementó en las células astrogliales debajo de las leptomeninges y alrededor de los vasos a los 3 días post-inoculación y, luego a los 5 días p.i., hubo activación y cambios en la astroglia. Tanto los astrocitos fibrosos como los protoplasmáticos se detectaron de forma simultánea en el parénquima cerebral cerca de las neuronas que presentaron apoptosis (112). Esto coincide también con los hallazgos de Machado et al (1997) quienes encontraron reacción de astrocitos tanto protoplasmáticos como fibrosos, en el hipocampo de bovinos infectados con rabia transmitida por quirópteros (109).

Aunque nosotros no hemos hallado partículas virales en los astrocitos otros autores han propuesto que los astrocitos podrían estar involucrados en la infección aguda por rabia de una manera directa (por infección) o inducida por neuronas infectadas. La marcación de células gliales en la capa I podría indicar la replicación del virus (161). A favor de esta posibilidad está el trabajo de Ray y colaboradores que utilizaron cuatro cepas de virus de la rabia y observaron la capacidad de infección en cultivos primarios de astrocitos (107). En perros de la raza Beagle, de dos años de edad, que se infectaron con cepas de virus de rabia de Etiopia de origen canino, se observaron nódulos de Babes compuestos de microglia, astrocitos y macrófagos en algunos de los animales. Ocasionalmente se mostraron pequeñas inclusiones en el citoplasma de los astrocitos. Estas inclusiones eosinofílicas oscilaban entre 1 y 4 μ m de diámetro, a veces múltiples, con vacuolas internas o gránulos. En el microscopio electrónico se encontró que los astrocitos infectados sólo se podían identificar con certeza en los procesos que estaban en contacto cercano con los capilares (barrera hematoencefálica) (21).

Zlotnik & Grant, encontraron pequeños agregados de partículas matriciales y virales dentro de los astrocitos. Experimentalmente se evidenció que con la tinción HE y la técnica modificada del oro sublimado de Cajal se pudieron observar los astrocitos en ratones de tres semanas de edad que fueron reinoculados con la cepa CVS por las dos rutas de inoculación IC e IM. Encontraron hipertrofia y proliferación de los astrocitos en varias áreas del cerebro incluyendo el cuerpo estriado y el hipocampo. Algunos astrocitos, sin embargo, mostraron cambios regresivos con fragmentación de procesos o incluso necrosis o signos de degeneración de cuerpos celulares hasta desaparecer completamente. El efecto directo del virus en la astroglia se pudo observar incluso en las etapas iniciales de la infección (154).

No obstante, la respuesta de los astrocitos a la infección por rabia también podría ser inducida por las células neuronales infectadas u otras células gliales, ya que en este y otros trabajos no se ha observado infección de astrocitos por el virus de la rabia. Esto es apoyado por un estudio que reportó que al infectar cultivos primarios de células gliales compuesto principalmente por astrocitos, no se detectaron partículas virales dentro de ellos (12). Por lo tanto, los cambios observados en los astrocitos podrían deberse no a la infección sino a una respuesta desencadenada por otras células gliales como la microglía

ya que estas células son el equivalente a los macrófagos del SNC, se relacionan con los astrocitos y desempeñan un papel importante en muchas infecciones virales para intentar limitar la replicación viral y así tratar de eliminar del virus (156,157,158). Feiden en 1988, estudiaron 38 casos de rabia en animales domésticos y silvestres utilizando dos anticuerpos, uno monoclonal que marcó para la proteína N y otro policlonal que señaló la proteína de virus ribonucleoproteína (RNP). Encontraron que en zorros se presenta esporádicamente RNP-positiva para astrocitos de las paredes de los vasos. También hallaron antígenos de rabia en oligodendrocitos interfasciculares (159).

En el presente trabajo, el virus de la rabia inoculado por la vía IM (la vía natural) no generó cambios en la inmunorreactividad de la GFAP en los astrocitos de la corteza cerebral. Pero cuando se inoculó por la ruta IC se presentó una reacción glial en la corteza motora de los cerebros de los ratones sugiriendo una reacción astrocitaria que podría generar cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales en las neuronas. Los datos reportados en este trabajo sugieren que las células microgliales y astrogiales reaccionan en respuesta a la infección en los periodos de tiempo evaluados y en especial por la reinoculación del virus. Esto es consistente con lo reportado en un estudio realizado en ratones y ratas infectados, que mostró aumento en los niveles de óxido nítrico sintasa inducida (iNOS), que genera óxido nítrico en los dos tipos de células ya mencionadas; además estas células permiten la liberación de citoquinas (160). Por lo tanto, las células gliales podrían estar implicadas en la patogénesis del virus de la rabia generando disfunción neuronal.

Quizás las diferencias en los resultados publicados se explican por los tipos de cepas virales utilizadas y la respuesta de cada especie infectada con el virus, además de la ruta de inoculación y el área encefálica estudiada. Por ejemplo, previamente habíamos observado escasa inmunoreacción a GFAP en el cuerpo calloso (113) pero intensa inmunorreactividad a la proteína en el bulbo olfatorio de ratones (114), en los dos casos, en animales inoculados por vía IM. Por otra parte, la GFAP es una proteína de citoesqueleto, y el grupo también ha reportado que el virus de la rabia afecta la expresión de proteínas de citoesqueleto neuronal, en particular, MAP2 y Neurofilamento (N-200) (125,142).

La astrogliosis reactiva y el aumento del área y del volumen celular de los astrocitos, como respuesta a la infección por el virus de la rabia podría ser uno de los componentes de la patogénesis de la rabia regulada por los astrocitos. Por un lado, la gliosis se produciría para amortiguar los efectos nocivos del virus al aumentar los astrocitos y la absorción de glutamato, si esta gliosis no es controlada se podría desencadenar parte de la patogénesis caracterizada por la expansión de filamentos de GFAP en procesos de astrocitos. Por lo tanto, los astrocitos pueden amortiguar de manera más eficiente los cambios neuroquímicos en el espacio alrededor de las neuronas (193,194).

En paralelo con el cambio en la expresión de GFAP, resultados previos del grupo de investigación muestran un aumento de la inmunorreactividad de parvoalbumina y de las neuronas glutamatérgicas y pérdida en las neuronas gabaérgicas, lo que sugiere que el virus de la rabia afecta el metabolismo de GABA y el glutamato de manera antagónica (14-16), y en este metabolismo participan los astrocitos. Adicionalmente se sabe que el edema o hinchamiento de los astrocitos se ha asociado con gradientes osmóticos generados por cambios en la actividad de transporte de iones, y en especial a los altos niveles de K^+ extracelular, el aumento en el Ca^{2+} y los niveles de cAMP intracelulares (162,163,164,165). El aumento del nivel de cAMP causaría la fosforilación de AQP4 (acuaporina) y el consiguiente aumento de la permeabilidad del agua de la membrana (166). Por lo tanto, los cambios sinérgicos en proteínas de unión a calcio, el transporte de iones con la expresión de GFAP generarían los gradientes osmóticos que explicarían el aumento del volumen de los astrocitos observados en este trabajo.

Otra explicación alternativa o complementaria del efecto del virus de la rabia sobre las células gliales podría ser a través de la activación de receptores tipo Toll 3, Toll-like receptor-3 (TLR3) que induciría una respuesta inflamatoria. En particular, TLR-3 sería activado por ARN bicatenario (dsRNA) del virus derivado de neuronas muertas y este dsRNA induciría inflamación en el SNC activando a los astrocitos que pueden expresar citosinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, $IFN\beta$, e IP10; además, I κ B quinasa (IKK), señal extracelular quinasa regulada (ERK) y quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) en CRT-MG (167). Una respuesta inflamatoria inducida por astrocitos podría alterar la BHE. La barrera hematoencefálica sirve para restringir el paso de macromoléculas y células desde la sangre hacia el tejido cerebral. Además, la mayoría de las células periféricas que invaden el cerebro son destruidas por la activación de la plasmina de astrocitos FasL (155). Se podría especular sobre la posible alteración de la BHE por cambios en los astrocitos en

cerebros de ratón infectados con el virus de la rabia lo que podría permitir que algunas subpoblaciones de células inflamatorias circulantes reactivas al virus de la rabia ingresen al cerebro y junto con los oligodendrocitos ser los responsables de la reacción glial observada así como de la patogénesis de la enfermedad. No obstante, hasta ahora no se ha demostrado ni viremia, ni la infección con rabia del tejido nervioso a través de la BHE. Lo que se conoce es que el virus ingresa y se disemina exclusivamente por las vías neuroanatómicas mediante transporte axonal retrógrado (5,7,120).

5.3 Inmunorreactividad de astrocitos a S100B

El homodímero multifuncional de enlace de calcio de tipo *EF-hand*, S100B, se considera un marcador específico de astrocitos (93,172). La S100B es sintetizada en los astrocitos, por esta razón, es en estas células gliales donde se encuentra en mayor concentración (172). Por lo tanto, interpretamos que los resultados aquí obtenidos relacionados con la distribución de las células inimmunorreactivas a S100B en la corteza cerebral de ratón, así como la sobreexpresión generada por la infección con rabia corresponden a la población de astrocitos corticales. Al comparar la inmunorreactividad de la S100B, con la inmunorreactividad de GFAP, en corteza de ratón, se deduce que muchos astrocitos presentan baja inmunorreactividad a GFAP. Se conoce que la GFAP es reactiva principalmente en astrocitos fibrosos (52), por lo tanto, los espacios de las capas corticales intermedias en ratón parecen contener principalmente astrocitos protoplasmáticos reactivos a S100B pero no a GFAP.

La S100B puede ejercer efectos autocrinos y paracrinos sobre las neuronas y la glía y se encuentra implicada en una amplia gama de procesos celulares, tales como fosforilación de proteínas, proliferación y diferenciación celular, organización estructural de membranas, modificaciones en el citoesqueleto, homeostasis y la promoción de la supervivencia celular (87,96,169). Se le han asignado propiedades neurotróficas (a concentraciones fisiológicas) o neurotóxicas (en mayores concentraciones) (170). Ejerce efectos neurotróficos sobre las neuronas estimulando la proliferación y regeneración de neuritas, mejorando la supervivencia de las neuronas durante el desarrollo y después de la lesión, y la prevención de la degeneración de las neuronas (89). Aunque se ha reportado el efecto de la rabia en proteínas de unión a calcio neuronales (117,127,131) no hay antecedentes publicados sobre el efecto de este virus neurotrópico en la expresión de la S100B en el tejido nervioso.

En este trabajo se encontró un aumento en la inmunorreactividad de la proteína S100B en cerebros infectados con el virus de la rabia. Aunque el cambio observado es de naturaleza descriptiva, resulta interesante discutir como este incremento contribuiría a explicar en parte la patogénesis de la rabia. La expresión de S100B está restringida a un número limitado de tipos celulares donde se encuentra co-localizada difusamente en el citoplasma y se asocia con membranas intracelulares, microtúbulos y filamentos intermedios de tipo III (171). El mayor nivel de expresión de la proteína S100B se encuentra principalmente en el citoplasma de astrocitos (172). La S100B es una proteína que censa y une dos iones de Ca^{2+} de esta manera modulan la actividad biológica. Se sabe que la S100B une calcio y zinc en sitios de unión muy definidos con diferentes afinidades para ambos iones en cada monómero y que las concentraciones fisiológicas del ión potasio antagonizan la unión de ambos cationes divalentes, afectando especialmente a los sitios de unión de calcio de alta afinidad (88). Un incremento de la S100B implica que el equilibrio iónico Calcio-Potasio-Zinc podría estar alterado.

Por otra parte, la proteína S100B unida a calcio puede activar a la kinasa STK38 la cual puede unirse a las caderinas y a las MAP kinasas; esto afectaría la adhesión celular y la capacidad proliferativa de los astrocitos. También se sabe que STK38 podría interactuar con un receptor en la membrana neuronal llamado receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) cuya señalización en la microglía contribuye a la neuroinflamación y podría desempeñar un papel en la apoptosis de los astrocitos al activar la señalización de ERK1/2 y p53/TP53. Los efectos de S100B sobre astrocitos son dependientes de la presencia y activación de RAGE, aunque la S100B podría estimular su propia liberación a través del compromiso RAGE (172,173).

Las concentraciones altas de Ca^{2+} extracelular pueden favorecer la formación de multímeros S100B lo que llevaría a la dimerización, estabilización y posterior activación de RAGE por la unión de S100B a su dominio V (89). El estado fisicoquímico, es decir, dimérico, tetramérico, octamérico u oligomérico de la S100B parece tener un papel importante en la duración de la activación de RAGE (90). La concentración subnanomolar o nanomolar (<100 nM) de S100B desencadena efectos neurotróficos promoviendo la supervivencia neuronal mediado por el receptor RAGE regulando positivamente el factor anti-apoptótico, Bcl-2, activando la vía de señalización PI3-K/Akt /NF- κ B (173). El cambio, la concentración submicromolar o micromolar (≥ 500 nM) de la proteína S100B extracelular ejerce efectos tóxicos sobre las neuronas ocasionando sobre estimulación de RAGE en

células neuronales resultando en el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de la vía MEK/ERK1/2, lo que conduce a la peroxidación de lípidos y activación de caspasa-3 causando la apoptosis (90,171,174). Los efectos autocrinos de la proteína S100B sobre los astrocitos son necesarios para la progresión de las respuestas inflamatorias (activación de la expresión de IL-6, TNF- α) mediados a través de su interacción con RAGE (96).

En un estudio realizado en ratones transgénicos la S100B muestra una mayor densidad en dendritas en el hipocampo de la etapa postnatal en comparación con los controles y al año de edad evidenciaron pérdida de dendritas. Los animales, que sobreexpresan S100B, mostraron déficits cognitivos demenciales (88). Aunque en este trabajo no se cuantificó la concentración ni el grado de agregación de S100B, los antecedentes apoyarían el papel de S100B en el crecimiento de las neuritas mediado por RAGE. Por lo tanto, la evidencia disponible permite sugerir que el virus de la rabia induce daño estructural glial y neuronal.

Con base en las funciones asociadas a S100B, esta proteína también podría ayudar al procesamiento citoplásmico de ATAD3A, una proteína esencial para la organización de la red y el metabolismo mitocondrial. Finalmente, por mediar la regulación dependiente de calcio podría estar involucrada en muchos procesos fisiológicos al interactuar con otras proteínas, como por ejemplo con la proteína CAPZA1 y la fosfatasa PPP5C. CAPZA1 es una proteína que bloquea la actina F al unirse en una forma dependiente de Ca²⁺ a los extremos de crecimiento rápido de los filamentos de actina y PPP5C es una fosfatasa que desfosforila y puede jugar un papel en la regulación de TAU/MAPT y algunos canales iónicos (192).

La S100B puede regular la morfología celular uniéndose a la tubulina inhibiendo y desmontando los microtúbulos de una manera Ca²⁺ dependiente. La S100B interactúa con la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) (87), proteína que ha sido implicada en las alteraciones morfológicas neuronales causadas por virus de la rabia (125,142). Por lo tanto, la S100B podría estar implicada en los cambios de la integridad y estabilidad del citoesqueleto neuronal en rabia.

Por otro lado, en un estudio realizado en cultivos primarios de astrocitos extraídos de la corteza, hipocampo y cerebelo de ratas recién nacidas, utilizaron las proteínas GFAP y S100B. Se observó que la morfología de los astrocitos en las diferentes regiones

cerebrales era distinta. Determinaron que el destino fenotípico de los astrocitos se determina en la embriogénesis y que los astrocitos neonatales ya están programados para desarrollar una morfología característica. La morfología celular depende de las vías de transducción de señales que regulan el ensamblaje de las proteínas del citoesqueleto. La morfología estrellada de los astrocitos está asociada a la regulación de RhoA y despolimerización de F-actina. La S100B activa ERK, un resultado que puede estar relacionado con el efecto de la proteína sobre la proliferación glial (169).

La sobreexpresión de S100B permite mayor liberación y acumulación de esta proteína en el espacio extracelular y el incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} por la unión de la S100B a la célula receptora, activa la fosfolipasa C y la consecuente formación de IP3 (92). Aunque en este trabajo no se estudió la distribución de la proteína S100B, se sabe que dependiendo de la concentración de la S100B a nivel extracelular, puede cumplir efectos tróficos o tóxicos es decir, a concentraciones nanomolares contribuye a la proliferación de neuritas y favorece la supervivencia de las neuronas durante el desarrollo, sin embargo, en concentraciones micromolares de la S100B puede estimular la expresión de citoquinas proinflamatorias e inducen apoptosis (92). Estudios *in vitro* muestran que los cambios en las concentraciones de esta proteína altera el comportamiento (74).

Gerlai y colaboradores realizaron experimentos en animales transgénicos hembras que sobreexpresaron los genes de la S100B en astrocitos del hipocampo, donde evidenciaron una disminución del potencial postsináptico excitatorio. Mostraron que la liberación del Ca^{2+} por los astrocitos se une a receptores neuronales induciendo una respuesta del Ca^{2+} intracelular dependientes de Ca^{2+} alterando los procesos sinápticos llevando a los animales a un comportamiento de hiperactividad (91). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de la S100B podría causar alteración neurofisiológica del hipocampo y podría estar relacionado con algunos cambios comportamentales en los ratones infectados con rabia.

El aumento en la inmunoreactividad y en el número de células inmunorreactivas para S100B, es consistente con el aumento de la expresión de S100B después de la activación glial aguda y se ha considerado como un mecanismo para la reparación de neuronas dañadas (175), así como con el aumento del Ca^{2+} y la apoptosis neuronal (85). Sin embargo, no es imprescindible que se presente muerte celular. Los niveles elevados de S100B que derivan de tejidos necróticos podrían favorecer la neurodegeneración por la

apoptosis inducida por S100B (170). En pacientes que sufren el trastorno neurodegenerativo crónico como la enfermedad de Alzheimer se han detectado altos niveles de la proteína S100B en astrocitos activados interactuando con las proteínas presenilina (PS1 y PS2) y la proteína precursora amiloide (APP), esta última forma las placas amiloides en los cerebros de las personas que padecen esta enfermedad (176). Por lo tanto, S100B tiene un papel en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y posiblemente en las manifestaciones clínicas de la rabia.

Además, S100B también podría estar involucrada en la función que los astrocitos desempeñan en el metabolismo del GABA y el glutamato los cuales se han encontrado alterados en cerebros infectados con rabia que experimentan aumento de la inmunorreactividad de parvoalbúmina y glutamato y pérdida en las neuronas GABAérgicas en ratones (9,14-16,117,131); un efecto similar se ha observado en neuronas GABAérgicas de la corteza cerebelosa de bovinos infectados con rabia (110). Por lo tanto, cambios en proteínas de unión a calcio (calbindina, parvoalbumina, S100B) en rabia sugieren una alteración de la homeostasis del calcio, tanto en neuronas como en células gliales, lo que podría indicar citotoxicidad acompañada de cambios de la neurotransmisión del sistema GABAérgico en estas células afectando el sistema motor descendente.

La S100B podría modular la plasticidad sináptica desde el espacio extracelular (172). Ratones mutantes desprovistos de S100B mostraron normalidad en el desarrollo y en la evaluación del potencial a largo plazo en el hipocampo (PLP). Estas observaciones y la hiperactividad de la S100B sugieren que S100B regula la actividad neuronal y la prevención de daño neuronal (172). En otro estudio, Onkati y colaboradores estudiaron por inmunohistoquímica la reactividad de la S100B en ratas infectadas con el virus de la enfermedad de Berna, BDV, un virus neurotrópico que genera astrogliosis, pero con disminución de la expresión de la proteína S100B en dos áreas estudiadas, la corteza cerebral y el cerebelo. La S100B actúa sinérgicamente con citoquinas proinflamatorias y, en concentraciones más altas, se comporta como una citoquina, amplificando y perpetuando la inflamación y causando daño oxidativo a las neuronas. Altos niveles de S100B regulan positivamente la expresión de IL-1 β en astrocitos y estimula la liberación de IL-6 y TNF- α de astrocitos (90). De este modo, S100B activaría los astrocitos actuando como un *switch*, de células tróficas a células que participan en la respuesta inflamatoria cerebral.

5.4 Inmunorreactividad de astrocitos a Vimentina

La vimentina es una proteína intracelular del citoesqueleto que se sintetiza en los astrocitos y se encuentra en todas las etapas y linaje de células astrocitarias (177). Aunque todos los astrocitos tienen GFAP y vimentina, estas dos proteínas no forman los mismos filamentos (178, 179). La red de citoesqueleto de células eucarióticas posee dos componentes: primero, sus polipéptidos varían según el origen embrionario de las células, y segundo, su expresión puede ser alterada durante el proceso de diferenciación celular (180). Aunque la vimentina juega un papel importante en la formación de los filamentos intermedios de los astrocitos no se han reportado estudios previos sobre el efecto del virus de la rabia en su expresión.

En este trabajo se observó inmunorreactividad a vimentina en la corteza cerebral, el hipocampo y el giro dentado de ratones. La marcación parece corresponder a glía radial, células características del neurodesarrollo que en roedores y otros mamíferos se preservan durante las primeras semanas del desarrollo postnatal y gradualmente desaparecen (188). La infección con virus de la rabia incrementó moderadamente la inmunorreactividad a la proteína en la corteza y con mayor intensidad en el hipocampo y giro dentado. Aunque en general la expresión de la vimentina en el cerebro de ratón adulto es insignificante en condiciones normales, en algunas circunstancias la vimentina y la GFAP pueden formar filamentos de copolímero (145). Durante el desarrollo embrionario del ratón, en el día 11, se observan procesos celulares de la vimentina en dirección radial (181), similares a los encontrados en este trabajo y se ha asociado que estas fibras radiales son precursores de astrocitos. En los estadios más tempranos del desarrollo la vimentina se encuentra en células con capacidad de diferenciación a glía y neuronas (182). En ratas evaluadas durante el desarrollo y adultas se muestra que la vimentina desaparece a partir del día 8 y 20 postnatal, mientras que la GFAP mostró un incremento en los astrocitos de las ratas adultas. No obstante, después de una lesión mecánica en la corteza cerebral a los dos días de edad, la vimentina reaparece mostrando morfología de glía radial en los bordes de la herida, los astrocitos marcados con GFAP rodeaban la herida demarcando una estructura de astrocitos reactivos. Estos estudios sugieren que las dos proteínas GFAP y vimentina están involucradas en procesos de desarrollo que implican cambios morfológicos y de diferenciación (168).

En etapas iniciales del desarrollo del SNC, los IFs de la glía radial y los astrocitos inmaduros están compuestos de vimentina. En etapas más avanzadas la GFAP reemplaza gradualmente a la vimentina. Además esta proteína actúa en la formación de la trama de la GFAP en ciertos astrocitos reactivos (74). En ratas normales lesionadas con láser, GFAP y vimentina se detectaron en la capa molecular cortical, donde había proliferación e hipertrofia de los astrocitos alrededor de la lesión donde hubo necrosis; los astrocitos presentaban procesos celulares gruesos y citoplasmas agrandados, y la vimentina marcó astrocitos fibrosos de la sustancia blanca en las partes distantes a la lesión. Los autores sugieren que la vimentina solo marca células que se someten a proliferación (183) por lo cual se ha considerado que la vimentina es un buen marcador de diferenciación.

La composición de heterómeros de vimentina y GFAP en astrocitos varía con el nivel de diferenciación celular (180). La célula al tener dos proteínas de filamentos intermedios (IFs) diferentes tiene la opción de formar homodímeros y dos diferentes redes de IFs o formar heteropolímeros y una red IF (78). Se sugiere que durante el proceso de diferenciación los astrocitos primero expresan vimentina, y posteriormente expresan la GFAP, lo que permite regular el nivel de rigidez ya sea incrementando o reduciendo el vínculo entre GFAP y vimentina en los IFs. Esto se asociaría con diferentes respuestas funcionales. Además varía su distribución dependiendo del requerimiento funcional de la región cerebral (78). En un experimento con ratones a los que se les hizo una herida en el encéfalo estos mostraron incremento en la expresión de vimentina y GFAP en el cuerpo caloso. Cuando se limitó la vimentina se disminuyó la expresión de GFAP y así mismo la formación de cicatriz glial, lo que sugiere que la manipulación de la vimentina podría evitar la cicatriz glial y ayudar a la regeneración axonal (79). Recientemente se ha propuesto que la vimentina permite a las células desplazarse al lugar afectado haciendo parte de la cicatriz glial. Además se observa aumento de la expresión de la GFAP en las células lejanas y alrededor del sitio de la lesión (184). Estos estudios sugieren que la regulación positiva de la vimentina y GFAP podría estar relacionada con la diferenciación, proliferación y migración de astrocitos en la construcción de la cicatriz glial.

Lempp y colaboradores estudiaron el virus del moquillo canino, un virus neurotrópico causante de leucoencefalitis desmielinizante en perros. Al ingresar el virus al encéfalo infecta principalmente a los astrocitos lo que permite su propagación y replicación. Se encontró antígeno viral en el 95% de los astrocitos en las etapas iniciales de la lesión

aguda, es decir, en los astrocitos inmaduros que expresaban vimentina. Aunque no mostraron alteraciones en los filamentos, en lesiones tempranas se encontraron antígenos virales en los astrocitos maduros que marcaban con la GFAP generando efectos citopáticos, lo que sugirió es que, estas condiciones pueden ayudar a la replicación, transcripción y traducción del virus y progresión de la lesión (185).

Aunque hay más estudios de vimentina y GFAP en modelos experimentales de lesión mecánica cortical, que por lesión asociada a virus, parece que durante la lesión, vimentina y GFAP se comportan de manera similar en cuanto a que la vimentina trabaja en conjunto con la GFAP en astrocitos en reposo y reactivos. En los ratones inoculados con rabia también se observó aumento de la inmunorreactividad a vimentina en la capas CA3 del hipocampo y polimórfica del giro dentado; esto puede sugerir que la vimentina se está reexpresando y quizás puede estar involucrada en la activación de genes del desarrollo en esta zona, como respuesta a la supervivencia de gliogenesis o neurogenesis (186,187).

Aunque se ha descrito que la vimentina no se detecta en astrocitos en encéfalo de roedor adulto normal, se sugiere que la vimentina es un marcador más específico para gliosis reactiva (74). A medida que el sistema nervioso madura, la vimentina disminuye por acción de la calpaina y se ha asociado el aumento en la síntesis de vimentina con el crecimiento rápido celular, presumiblemente debido a la amplia división y remodelación de los componentes del citoesqueleto necesarios para la mitosis y la migración en la rápida división y reestructuración de las poblaciones de la glía radial (188). Por lo tanto, es posible proponer que los incrementos en la inmunorreactividad de vimentina están asociados con la proliferación de células gliales. Poco se sabe sobre su papel en astrocitos, sin embargo en las lesiones de la corteza entorrinal se observa un aumento en el número de astrocitos activados. Aunque se cree que la mayoría de los astrocitos activados se hipertrofian sin síntesis de ADN, una pequeña subpoblación podría estar proliferando. Debido a que la astrogliá hipertrófica o hiperplásica expresa vimentina, la presencia de vimentina en astrocitos adultos puede considerarse un marcador general para la activación astrogliá. Estos hallazgos indican que la vimentina puede servir como un organizador de cambios citoarquitectónicos durante las respuestas a la proliferación y dediferenciación de la glía que es regulada por los factores de transcripción JUN-FOS (AP-1), porque las regiones regulatorias de los genes de vimentina y GFAP contiene sitios de unión al DNA para el complejo heterodímero AP-1 y NF-1, que es otro elemento regulatorio putativo que se encuentra en los promotores de los genes que codifican para las proteínas GFAP y

vimentina (189). Estos antecedentes y lo observado en el presente trabajo, permiten proponer que la infección del encéfalo por el virus de la rabia induce la activación de genes regulados por el factor de transcripción AP-1, tales como la vimentina y la GFAP.

Los resultados descritos en este trabajo y los reportados en la literatura, en conjunto, sugieren que la patología de la infección por virus rábico observada en diferentes especies muestran características diferenciales que se pueden explicar en parte por la vía de la infección, por el tipo de cepa del virus, por el sistema inmunológico y la susceptibilidad a la rabia (112). Los astrocitos reactivos pueden afectar la función neuronal a través de la regulación del flujo sanguíneo, la función sináptica y su plasticidad (58,48). La evidencia indica que las disfunciones del proceso de astrogliosis reactiva tiene el potencial de contribuir o ser una de las causas de la patogénesis de la rabia, bien sea por la pérdida de funciones normales o por ganancia de efectos anormales (190,191,139). Los cambios observados apoyan la hipótesis de que la patogénesis y la manifestación clínica de la rabia se puede dar por una respuesta celular y humoral en la que las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, microglia y glia de Bergmann) y las citoquinas que producen juegan un papel central (159), lo cual implica que en la patogénesis de la rabia podría haber un tropismo celular diferencial y más amplio, así como el compromiso funcional de los astrocitos en el curso natural de la infección en la que la GFAP, la proteína S100B y la vimentina juegan un papel estructural y funcional en la respuesta del encéfalo a la infección por rabia.

5.5 Ultraestructura de astrocitos en tejido infectado

En el material aquí estudiado no se observaron partículas virales ni antígenos de rabia en ninguno de los astrocitos observados en el microscopio electrónico. Tampoco se hallaron efectos sobre la ultraestructura al comparar las células de material infectado con los controles. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por otros autores en la gran mayoría de publicaciones científicas que se consultaron (2,99,101, 104). Así se ratifica el carácter 'neurotrópico' del virus de la rabia de acuerdo con el conocimiento actual. Probablemente en las células gliales no existen receptores específicos para el virus de la rabia, y quizás esta sea una de las razones por las cuales el virus de la rabia no pueda ingresar y diseminarse a través de la barrera hematoencefálica. Por otra parte, el hecho de que no se presente daño estructural aparente en los astrocitos y en las neuronas, aún

en fase avanzada de la enfermedad, confirma el postulado de los investigadores que atribuyen la escasa reacción tisular y celular a una estrategia de supervivencia y diseminación del virus. El patógeno se dispersa por todo el tejido nervioso antes de causar la muerte del hospedero (5,100).

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

1. Los resultados de este trabajo confirman la apreciación generalizada de los neuropatólogos que por décadas han hecho énfasis en la escasa reacción glial a la infección con el virus de la rabia.
2. Igualmente se confirma que las células gliales rara vez son infectadas por el virus.
3. Dos proteínas de filamento intermedio, la GFAP y la vimentina, presentan una reacción apenas moderada a la infección con rabia en la corteza cerebral de ratón, a diferencia de lo que ocurre con otras neuropatologías de origen infeccioso.
4. La inmunorreactividad a GFAP inducida mediante la inoculación intracerebral del virus revela que es posible la reacción astrogliar a la rabia pero que esta depende del tipo de virus, de la ruta de inoculación, de la especie hospedera y del área del sistema nervioso afectada.
5. La notable sobreexpresión de la proteína S100B en los astrocitos de la corteza cerebral afectada por rabia, confirma el efecto de esta infección sobre el metabolismo celular del calcio, tal como se ha comprobado también en neuronas.

6.2 Recomendaciones

Es necesario profundizar en el conocimiento del efecto de la rabia en los astrocitos y demás células gliales. Quizás la respuesta morfológica no sea tan evidente como tampoco lo es en las neuronas, pero si se refinan los métodos de investigación, posiblemente en la glía se pueda encontrar parte de la explicación del carácter letal de esta infección viral y hallar luces que conduzcan a desarrollar terapias curativas.

A.Anexo: Coloración de hematoxilina-eosina

1. Fijar el cerebro en formaldehido durante 72 horas. Cortar los cerebros en bloques
2. Realizar cortes coronales de 1cm
3. Transferir de nuevo los cortes al fijador por 72 horas
4. Deshidratación en concentraciones ascendente (70%, 96%, 100%) de 2 propanol, Preimbibición en xilol e infiltración en parafina caliente.
5. Incluir en parafina
6. Cortar a 10 micras
7. Desparafinar e hidratar
8. Dejar en hematoxilina
9. Quitar el exceso lavando con agua corriente
10. Diferenciar con agua amoniacal 5% (20 ml de amonio y 380 ml agua destilada)
11. Volver a lavar con agua caliente
12. Pasar por alcohol Isopropanol al 80%
13. Pasar por eosina. Lavar con agua corriente. Deshidratar, aclarar y montar

B. Anexo: Inmunohistoquímica para marcadores astrogliales

1. Realizar cortes en vibrátomo de 30-50 μm y recoger en mini-cajas de Petri de 1,5 ml con tampón fosfato salino (PBS). Se deja en agitación 24 horas. Todos los tratamientos y lavados se hacen a temperatura ambiente y agitación constante.
2. Desenmascaramiento de antígenos con NH_4Cl 0,05M (0.03 gr en 10 ml de PBS) para GFAP y S100B o con tripsina al 0.1% a 37°C para vimentina (30 min).
3. Lavados en PBS (10',5',5').
4. Inhibición de la peroxidasa endógena (H_2O_2 3% en PBS) (30 min).
5. 3 lavados en PBS (10',5',5').
6. Tratamiento con solución de bloqueo: por cada 5 ml de PBS adicionar a cada muestra lo siguiente:
 - 150 μL de suero normal de cabra
 - 150 mg de albumina sérica bobina (BSA)
 - 50 μL de Tritón 10%. NO LAVAR (30 min).
7. Incubación en anticuerpo primario (policlonal anti-GFAP, vimentina y S100B). (Incubación 24 horas).
Diluciones (A partir de una alícuota en dilución 1:10)
 - GFAP 1:1000
 - Vimentina 1:1000

- S100B 1: 500

8. 3 lavados en PBS (10',5',5').

9. Incubación en anticuerpo secundario anti-conejo dilución 1:400 (1 μ L de la solución del anticuerpo en 1 ml de PBS por caja) (2 horas).

10. 3 lavados en PBS (10',5',5').

11. Tratamiento en la solución ABC (Complejo Avidina-Biotina) (2 horas).

- (1 gota de A + 1 gota de B en 5 ml de PBS)

12. 3 lavados en PBS (5' c/u).

13. Revelado con el kit DAB-Niquel. Por cada 2,5 ml de H₂O destilada adicionar: 1 gota de buffer, 2 gotas de DAB, 1 gota de H₂O₂ y 1 gota de Niquel (1 min).

C.Anexo: Inmunomicroscopía electrónica con GFAP

1. Las muestras se fijan con paraformaldehído al 4%.
2. Obtener cortes en vibrátomo de 100-200 μm . Incubar en buffer fosfato (PB), pH 7,4. (24 horas).
3. 3 lavados en PB (10'c/u).
4. Tratamiento con NH_4Cl 0,05M (0.03 gr en 10 ml de PBS) (30 min).
5. 3 lavados en PB (10', 5', 5').
6. Inactivación de peroxidasa endógena (H_2O_2 30% en PBS; 1 ml + 9 ml) (10min).
7. 3 lavados en PB (5' c/u).
8. Tratamiento para penetración de anticuerpos (Etanol 10%, 5'; EtOH 20%, 5'; EtOH 10%, 5').
9. 3 lavados en PB (5' c/u).
10. Bloqueo en suero normal: por cada 5 ml de PB adicionar a cada muestra lo siguiente: (60 min)
 - 150 μL de suero normal de cabra

- 150 mg de albumina sérica bobina (BSA)

NO LAVAR

11. Incubación en anticuerpo primario (policlonal anti-GFAP). (Incubación 20 horas).

Dilución a partir de una alícuota en dilución 1:10

- GFAP 1:1000

12. 3 lavados en PB (10' c/u).

13. Incubar en anticuerpo secundario anti-conejo dilución 1:400 (1µL de la solución del anticuerpo en 1ml de PB por caja) (2 horas).

14. 3 lavados en PB (10' c/u).

14. Tratamiento en solución ABC (Complejo Avidina-Biotina) (2 horas).

- (1 gota de A + 1 gota de B en 5 ml de PB).

15. 2 lavados en PB (5' c/u) y 2 lavados en Tris-HCl, pH 7,4 (5' c/u).

16. Incubar en $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 1% en Tris-HCl, pH 7,4 (20 min).

17. 2 lavados en Tris-HCl, pH 7.4, 5' c/u y 2 lavados en PBS, 5' c/u.

18. Revelado con DAB. Por cada pastilla (1% p/v) diluida en 10 ml de PB, adicionar 1,2µl de H_2O_2 (1 min).

Luego se procesan los cortes para **microscopía electrónica** así:

19. Lavar y dejar en PB (20 horas).

20. Post fijación: los cortes se tratan con OsO_4 1% en refrigeración, agitando cada 15 minutos (2 horas)

21. Lavar 3 veces con PB por 10 min cada una.
22. Deshidratar en Etanol; 50%, 15'; 70%, 15'; 90%, 15'; 95%, 15'x2; 100%, 15'x3 y oxido de propileno 15'x2.
23. Infiltrar los cortes en resina Durcupan + oxido de propileno 1:1 (5ml + 5ml) (24 horas)
24. Infiltrar en resina Durcupan + oxido de propileno 2:1 (10ml + 5ml) (24 horas)
25. Transferir los cortes a resina pura (Durcupan)
26. Incluir en resina pura sobre láminas de vidrio con antiadherente o en capsulas Beem.
27. Polimerizar durante 72 horas a 70°C.
28. Obtener cortes en ultramicrotomo de 60 nm y observar en el ME

Referencias

- 1- World Health Organization. Human rabies: 2016 updates and call for data. *Wkly Epidemiol Rec.* 2017; 92: 77-88
- 2- Iwasaki Y, Tobita M. Pathology. En: Jackson A, Wunner H, editores. *Rabies.* San Diego: Academic Press; 2002. p. 283-306.
- 3- Willoughby R, Tieves K, Hoffman G, Ghanayen M, Lefond C. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Eng J Med.* 2005; 352: 2508-14.
- 4- World Health Organization. WHO Expert consultation on rabies. En: *Technical Report Series No. 982.* Geneva: WHO Press; 2013. p. 1-139.
- 5- Tsiang H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. *Adv Virus Res* 1993; 42: 375-412.
- 6- Jackson AC. Therapy of rabies encephalitis. *Biomédica* 2009; 29: 169-76.
- 7- Jackson AC, Fu ZF. Pathogenesis. En: Jackson AC, editor. *Rabies: Scientific basis of the disease and its management.* San Diego: Academic Press; 2013. p. 299-349.
- 8- Kristensson K, Dastur DK, Manghani DK, Tsiang H, Bentivoglio M. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of Negri inclusion bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22: 179-87.
- 9- Torres-Fernández O. Estudio morfológico, inmunocitoquímico y ultraestructural de las neuronas de la corteza cerebral en ratones afectados por rabia. Tesis Doctoral. Instituto Nacional de Salud-Universidad del Valle. 2004. 150 p.
- 10- Haim L, Rowitch D. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 2017; 18(1): 31-41.
- 11- Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astroцитos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología* 2015; 30(2): 119-29.
- 12- Tsiang H, Koulakoff A, Bizzini B, Berwald-Netter Y. Neurotropism of rabies virus. An in vitro study. *J. Neuropathol Exp Neurol* 1983; 42: 439-52.

- 13- Matsumoto S. Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain. *J Cell Biol.* 1963; 19: 565-91.
- 14- Rengifo AC, Torres-Fernández O. Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados por rabia. *Biomédica* 2007; 27:548-58.
- 15- Santamaría G, Rengifo AC, Torres-Fernández O. Expresión de glutamato en la corteza cerebral de ratones normales y ratones infectados con el virus de la rabia. *Revista Científica Unincca* 2010; 15: 67-81.
- 16- Rengifo AC. Inmunorreactividad de neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas en la corteza y el cerebelo de ratones infectados con rabia. Tesis Magister en Neurociencias Bogotá: INS - Universidad Nacional de Colombia, 2012.
- 17- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 7-35.
- 18- Perea G, Araque A. Nuevas vías de información en el sistema nervioso: comunicación entre astrocitos y neuronas. *Rev Neurol* 2003; 36: 137-44.
- 19- Ruiz M, Chávez C. Rabies in Latin America. *Neurol Res* 2010; 32; 272-7.
- 20- Vigilato M, Cosivi O, Clavijo A, Silva H. Rabies update for Latin America and the Caribbean. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 678-9.
- 21- Fekadu M, Chandler M, Harrison A. Pathogenesis of Rabies in Dogs Inoculated with an Ethiopian Rabies Virus Strain. Immunofluorescence, Histologic and Ultrastructural Studies of the Central Nervous System. *Arch Virol.* 1982; 71: 109-26.
- 22- Wilkinson L. History. En: Jackson A, Wunner H, editores. *Rabies.* San Diego: Academic Press; 2002. p. 1-22.
- 23- Páez A, Nuñez C, García C, Boshell J. Epidemiología molecular de epizootias de rabia en Colombia, 1994-2002: evidencia de rabia humana y canina asociada a quirópteros. *Biomédica* 2003; 23: 19-30.
- 24- Valderrama J, García I, Figueroa G, Rico E, Sanabria J, Rocha N, et al. Brotes de rabia humana transmitida por vampiros en los municipios de Bajo y Alto Baudó, departamento del Chocó, Colombia 2004-2005. *Biomédica* 2006; 26: 387-96.
- 25- Paéz A, Rey G, Agudelo C, Dulce A, Parra E, Díaz-Granados H, et al. Brote de rabia urbana transmitida por perros en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008. *Biomédica* 2009; 29: 424-36.

- 26- Ministerio de Salud y Protección Social (Colombia). Boletín de Prensa 274. Septiembre 2014. <https://www.minsalud.gov.co/>
- 27- Redacción El Tiempo. Sección salud. Muerte de mujer por rabia prende las alertas en el país. 02 de febrero 2017. Consultado el 2 de febrero de 2017. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/estilo-de-vida/salud/mujer-muere-por-rabia-en-colombia/16807133>
- 28- Wunner WH. Rabies virus. En: Jackson AC, Wunner WH, editores. Rabies. San Diego: Academic Press; 2002. p. 23-77.
- 29- Toro G, Raad J. Rabia. En: Toro G, Raad J, Hernández C, editores. INS 1917-1997, una historia, un compromiso. Bogotá: Imprenta Instituto Nacional de Salud; 1997. p.309-18.
- 30- Jackson AC. Human disease. En: Jackson A, Wunner H, editores. Rabies. San Diego: Academic Press; 2002. p. 283-307.
- 31- Nieuwenhuys R. The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol* 1994;190:307-37.
- 32- Rockel A, Hiorns R, Powell T. The basic uniformity in structure of the neocortex. *Brain*. 1980; 103: 221-44.
- 33- Valverde F. Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev Neurol*. 2002; 34: 758-80.
- 34- Peters A, Jones E. Classification of cortical neurons. En: Peters A., Jones E, editores. Cerebral Cortex. vol. 1. Cellular components of the cerebral cortex. New York: Plenum Press; 1984. p. 107-121.
- 35- Petroff O. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 2002; 8: 562-73.
- 36- Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1: 41-50.
- 37- Lavenex P, Banta LP, Amaral DG. Postnatal development of the primate hippocampal formation. *Dev Neurosci*. 2007; 29: 179–92.
- 38- Kiernan JA. Barr. El sistema nervioso humano: una perspectiva anatómica. 9ª Ed. México: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
- 39- Menini A, Lagostena L, Boccaccio A. Olfaction: from odorant molecules to the olfactory cortex. *News Physiol Sci*. 2004; 19: 101-4.
- 40- Sauvageot CM, Stiles CD. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12:244–249.

- 41- Gonzalez-Perez O, Lopez-Virgen V, Quiñones-Hinojosa A. Astrocytes: everything but the glue. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015; 2: 115-7.
- 42- Parpura V, Haydon PG. (Eds.). *Astrocytes in (patho) physiology of the nervous system.* New York: Springer; 2009.
- 43- Peters A, Palay SL, Webster H. *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells.* Oxford: Oxford University Press; 1991 p.1-493.
- 44- Redwine JM, Evans CF. Markers of central nervous system glia and neurons in vivo during normal and pathological conditions. En: Dietzschold B, Richt JA. Editors. *Protective and pathological immuno responses in the CNS.* Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2002.
- 45- Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; 9:135-41.
- 46- Kimelberg HK. Astrocyte heterogeneity or homogeneity? En: Parpura V, Haydon PG. Editors. *Astrocytes in (patho) physiology of the nervous system.* New York: Springer; 2009. p. 1-25.
- 47- Freeman M, Rowitch D. Evolving Concepts of Gliogenesis: A Look Way Back and Ahead to the Next 25 Years. *Neuron.* 2013; 80(3): 613-23.
- 48- Parpura V, Heneka T, Montana V, Oliet S, Schousboe A, Haydon P, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 2012; 121: 4–27
- 49- Galou M, Colucci-Guyon E, Ensergueix D, Ridet JL, Gimenez y Ribotta M, Privat A, Babinet C, Dupouey P. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J Cell Biol.* 1996; 133(4):853-63.
- 50- Halassa, M, Fellin T, Takano H, Dong J, Haydon, P. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci.* 2007; 27: 6473-77.
- 51- Bélanger M, Allaman I, Magistretti P. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism.* 2011; 14: 724-38.
- 52- Miller R, Raff M. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* 1984; 4: 585-92.
- 53- Freeman M, Rowitch D. Evolving Concepts of Gliogenesis: A Look Way Back and Ahead to the Next 25 Years. *Neuron.* 2013; 80(3): 613-23.
- 54- Haim L, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18: 31-41.

- 55- Garcia A, Petrova R, Eng L, Joyner A. Sonic hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *J Neurosci*. 2010; 30(41): 13597–13608.
- 56- Scemes E, Spray DC. (Eds.). *Astrocytes wiring the brain*. Boca Raton: CRC Press; 2012.
- 57- Barreto G, Gonzalez J, Capani F, Morales L. Role of Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. En: Raymond Chuen-Chung Chang. *Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring*. ed. InTech; 2011. p. 257-72.
- 58- Rodnigh RB, Gottfried C. Morphological plasticity of rodent astroglia. *J. Neurochem*. 2012 10.1111/jnc.12087: 1-13.
- 59- Molofsky A, Krenick R, Ullian E, Tsai H, Deneen B, Richardson W. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & Dev* 2012; 26: 891–907
- 60- Kashon M, Ross G, O'Callaghan J, Miller D, Petrovitch H. Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimer's Dis* 2004; 6: 595–604.
- 61- Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006; 2(12): 679-89.
- 62- Eng L, Gerstl B, Vanderhaeghen J. A study of proteins in old multiple sclerosis plaques. *Trans. Am Soc Neurochem*. 1970; 1: 42.
- 63- Şovrea AS, Boşca AB, Georgiu C, Constantin AM, Ben Abdalah MA, Gheban D. The diagnostic value of immunohistochemistry and silver impregnation techniques for characterization of normal, reactive and tumoral astrocytes. *Rom J Morphol Embryol*. 2014; 55(2 Suppl): 525-38.
- 64- Zhao C, Deng W, Gage F. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008; 132: 645-660.
- 65- McLendon R. Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol*. 1994; 4: 221-8
- 66- Middeldorp J, Hol E. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011; 93: 421–443.
- 67- Korolainen MA, Auriola S, Nyman TA, Alafuzoff I, Pirttila T. Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol Dis*. 2005; 20: 858–870.
- 68- Boyd S, Nair B, Ng S, Keith J, Orian J. Computational Characterization of 39 Splice Variants in the GFAP Isoform Family. *Journals.Plos.Org* 2012; 7: e33565.

- 69- Choi BH, Kim RC, Lapham LW. Do radial glial give rise to both astroglial and oligodendroglial cells? *Brain Res Dev Brain Res.* 1983; 8: 119-130.
- 70- Zhang SC. Defining glial cells during CNS development. *Nature.* 2001; 2: 840-843.
- 71- Hynes R, Destree A. 10 nm filaments in normal and transformed cells. *Cell* 1978; 13: 151-163.
- 72- Steinert PM, Liem RK. Intermediate filament dynamics. *Cell.* 1990; 60: 521-523.
- 73- Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocytesecreted vimentin. *Br J Pharmacol.* 2013; 168: 903-919.
- 74- Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010; 2: 558-570
- 75- Chou Y, Khuon S, Herrmann H, Goldman R. Nestin promotes the phosphorylation dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell.* 2003; 14: 1468–78.
- 76- Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75: 5034-5038.
- 77- Liem, RK, Yen SH, Salomon GD, Shelanski M. Intermediate filaments in nervous tissues. *J Cell Biol* 1978; 79: 637-645.
- 78- Abd-El-Basset E, Ahmed I, Kalnins V, Fedoroff S. Immuno-Electron Microscopical Localization of Vimentin and Glial Fibrillary Acidic Protein in Mouse Astrocytes and Their Precursor Cells in Culture. *Glia* 1992; 6: 149-153.
- 79- Galou M, Colucci-Guyon E, Ensergueix D, Ridet JL, Gimenez Y, Ribotta M et al. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J Cell Biol.* 1996; 133: 853-63.
- 80- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C et al. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274: 23996-24006.
- 81- Pekny M, Nilsson M. Astrocyte Activation and Reactive Gliosis. *GLÍA.* 2005; 50: 427-34.
- 82- Hyder C. Tuning Cell Motility - Roles of Nestin and Vimentin in Cancer Cell Invasion. Finland, 2014.
- 83- Levin E, Acharya N, Sedeyn J, Venkataraman V, D'Andrea M, et al. Neuronal expression

- of vimentin in the Alzheimer's disease brain may be part of a generalized dendritic damage-response mechanism. *Brain Res.* 2009; 1298: 194-207.
- 84- Hol E, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 32: 121-30.
- 85- Moore B. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Comm* 1965; 19: 739-744.
- 86- Donato R, Cannon B, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K et al. Functions of S100 Proteins. *Curr Mol Med.* 2013; 13(1): 24–57.
- 87- Zimmer D, Cornwall E, Iandar A, Song W. The S100 Protein Family: History, Function, and Expression. *Brain Res Bull.* 1995; 37(4): 417-29.
- 88- Heizmann C, Fritz G, Schäfer B. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 2002; 7: d1356-1368.
- 89- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793: 1008-22.
- 90- Leclerc E, Fritz G, Vetter S, Heizmann C. Binding of S100 proteins to RAGE: An update. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793: 993–1007.
- 91- Gerlai R, Wojtowicz J, Marks A, Roder J. Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learning & memory* 1995; 2: 26-39.
- 92- Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1450: 191-231.
- 93- Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shanagawa R, Kagamiishi. S100B: astrocyte specific protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2006; 1: 11-6.
- 94- Eldik V, Griffin W. S100b expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1223: 398-403.
- 95- Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschan HR. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature.* 1980; 286: 400-1.
- 96- Ohtaki N, Kamitani W, Watanabe Y, Hayashi Y, Yanai H, Ikuta K, et al. Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus. *J Virol* 2007; 81: 5940-8.
- 97- Grahn A, Hagberg L, Nilsson S, Blennow K, Zetterberg H, Studahl M. Cerebrospinal fluid

- biomarkers in patients with varicella-zoster virus CNS infections. *J Neurovirol* 2013; 260: 1613-21.
- 98- Dempsey B, Rintala-Dempsey A, Shaw A. S100 Calcium-Binding Protein. *Encyclopedia of Signalling Molecules*. 2012. p. 1711-1717.
- 99- Rossiter JP, Jackson AC. Pathology. En: Jackson AC, editor. *Rabies: Scientific basis of the disease and its management*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 351-86.
- 100- Hemachudha T, Ugolini G, Wacharapluesadee S, Sungkarat W, Shuangshoti S, Laothamatas J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2013; 12: 498-51.
- 101- Rodríguez G. *Microscopía electrónica de la infección viral*. Bogotá: Imprenta Instituto Nacional de Salud; 1983. p.119-39.
- 102- Matsumoto S. Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain. *J Cell Biol*. 1963; 19: 565-91.
- 103- Miyamoto K, Matsumoto S. Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J Exp Med*. 1967; 125: 447-56.
- 104- Hummeler K, Atanasiu P. Electron Microscopy. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: WHO Press; 1996. p. 209-15.
- 105- Iwasaki Y, Clark HF. Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. *Experimental rabies in mouse*. *Lab Invest*. 1975; 33: 391-9.
- 106- Feiden W, Feiden U, Gerhard L, Reinhardt V, Wandeler A. Rabies encephalitis: immunohistochemical investigations. *Clin Neuropathol* 1985; 4: 156-64.
- 107- Ray NB, Power C, Lynch WP, Ewalt LC, Lodmell DL. Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. *Arch Virol* 1997; 142: 1011-9.
- 108- Zlotnik I. The reaction of astrocytes to acute virus infections of the central nervous system. *Br J Exp Pathol* 1968; 49: 555-64.
- 109- Machado GF, Alessi AC. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive astrocytes in the CNS of normal and rabies-infected adult cattle. I. Hippocampus and dentate gyrus. *Braz J Vet Res Anim* 1997; 34: 345-8.
- 110- Verdes JM, Ferreira FJ, Sabalsagaray MJ, Okada K, Calliari A, Moraña JA, et al. Calbindin D28k distribution in neurons and reactive gliosis in cerebellar cortex of natural

- rabies virus-infected cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2016; 28(4): 361-368.
- 111- Titeux M, Galou M, Gomes FC, Dormont D, Neto VM, Paulin D. Differences in the activation of the GFAP gene promotor by prion and viral infections. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002; 109: 119-27.
- 112- Kojima D, Park C, Tsujikawa S, Kohara K, Hatai H. Lesions of the Central Nervous System Induced by Intracerebral Inoculation of BALB/c Mice with Rabies Virus (CVS-11). *J Vet Med Sci.* 2010; 72(8): 1011–16.
- 113- Hurtado AP, Torres-Fernández O. Inmunorreactividad de la proteína ácida fibrilar de la glía en el cuerpo calloso de ratones y efecto de la infección con el virus de la rabia en su expresión. *Biomédica.* 2015; 35 (Supl.3):219-20.
- 114- Torres-Fernández O, Daza NA, Santamaría G, Hurtado AP, Monroy-Gómez J. Entry of rabies virus in the olfactory bulb of mice and effect of infection on cell markers of neurons and astrocytes. *Int J Morphol.* 2018;36 (En proceso de impresión).
- 115- Lamprea N, Torres-Fernández O. Evaluación inmunohistoquímica de la expresión de calbindina en el cerebro de ratones en diferentes tiempos después de la inoculación con el virus de la rabia. *Colom Med.* 2008; 39 (Supl. 3): 7-13.
- 116- Santamaría G. Estudio preliminar de la inmunorreactividad a glutamato en la corteza cerebral de ratones normales y ratones infectados con el virus de la rabia. Tesis de Pregrado. Instituto Nacional de Salud-Universidad INCCA de Colombia. 2008. p 47.
- 117- Torres-Fernández O, Yepes G, Gómez J, Pimienta H. Efecto de la infección por el virus de la rabia sobre la expresión de parvoalbúmina, calbindina y calretinina en la corteza cerebral de ratones. *Biomédica.* 2004; 24: 63-78.
- 118- Valverde F. Golgi atlas of the postnatal mouse brain. Viena: Springer-Verlag; 1998.
- 119- Paxinos G, Keith B. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 2001.
- 120- Torres-Fernández O, Santamaría G, Monroy-Gómez J. Dinámica neuroanatómica de infección celular en la ruta de dispersión del virus de la rabia en ratones inoculados por vía intramuscular. *Biomédica.* 2015; 35 (Supl.3): 113-4.
- 121- Torres-Fernández O, Lamprea N, Pimienta H. Demostración del ingreso del virus de la rabia a la corteza cerebral a través de las neuronas piramidales de la capa V. *Iatreia* 2005; 18(4): S85-S86.
- 122- Torres-Fernández O, E. Yepes G, E. Gómez J. Alteraciones de la morfología dendrítica neuronal en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia: un estudio

con la técnica de Golgi. *Biomédica*. 2007; 27: 605-13.

- 123- Torres-Fernández O, Monroy-Gómez J, Sarmiento LE. Unusual ultrastructural findings in dendrites of pyramidal neurons in the cerebral cortex of rabies-infected mice. *PeerJ PrePrints* 2015 <http://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.847v1.89>
- 124- Torres-Fernández O, Monroy-Gómez J, Sarmiento LE. Ultraestructura dendrítica en neuronas piramidales de ratones inoculados con el virus de la rabia. *Revista Biosalud*. 2016; 15: 9-16.
- 125- Hurtado AP, Rengifo AC, Torres-Fernández O. Immunohistochemical overexpression of MAP-2 in the cerebral cortex of rabies-infected mice. *Int J Morphol*. 2015; 33(2): 465-70.
- 126- Torres-Fernández O, Santamaría G, Rengifo AC, Monroy-Gómez J, Hurtado AP, Rivera JA, Sarmiento L. Patología dendrítica en rabia: estudio neurohistológico, inmunohistoquímico y ultraestructural en ratones. *Rev Asoc Colom Cienc Biol*. 2014; 26(2): 99-110.
- 127- Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JH, Pimienta HJ. Calbindin distribution in cortical and subcortical brain structures of normal and rabies infected mice. *Int J Neurosci* 2005; 115: 1372-85.
- 128- Habel K. Habel test for potency. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory techniques in rabies*. Geneve: World Health Organization; 1996. p. 369-373
- 129- Ribeiro-Da-Silva A, Priestley J, Cuello C. Pre-embedding ultrastructural immunocytochemistry. En: Cuello E, editor. *Immunohistochemistry II*. Chichester: John Wiley & Sons; 1993. p. 181-227.
- 130- Torres-Fernández O, Yepes GE, Sarmiento L. Colocalización inmunocitoquímica y ultraestructural del virus de la rabia en neuronas de la corteza cerebral que expresan proteínas ligadoras de calcio (CaBP). *Infectio*. 2004; 8(2): 115.
- 131- Monroy-Gómez J, Torres-Fernández, O. Distribución de calbindina y parvalbúmina y efecto del virus de la rabia sobre su expresión en la médula espinal de ratones. *Biomédica*. 2013; 33: 564-73.
- 132- Scheffler WC. *Bioestadística*. Fondo Educativo Interamericano. México; 1981. p. 218-21.
- 133- Edwards P. Origin 7.0: Scientific Graphing and Data Analysis Software. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2002; 42(5): 1270-71.

- 134- Carrisoza G, Liu Y, Flores D, Else C, Lee HG, Rhodes G, et al. Effects of biomechanical forces on signaling in the cortical collecting duct (CCD). *Am J Physiol Ren Physiol*. 2014; 307(2): F195-204.
- 135- Calvi T, Sánchez M, Rojas P. Morfometría de la neoplasia intraepitelial cervical. Caracterización en biopsias por ponche Hospital" VI Lenin" 1997. *Correo Científico Médico de Holguín*. 1998; 2(4): 4.
- 136- Palkovits M, Mezey É, Hamori J, Szentagothai J. Quantitative histological analysis of the cerebellar nuclei in the cat. I. Numerical data on cells and on synapses. *Exp Brain Res*. 1977; 28(1): 189-209.
- 137- Santamaría G, Monroy-Gómez J, Torres-Fernández O. Evidencia neuroanatómica del transporte del virus de la rabia a través de la vía propioespinal en la médula espinal de ratones. *Biomédica*. 2018;38(2):
DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3711>
- 138- Lamprea N, Ortega L, Santamaria G, Sarmiento L, Torres-Fernández O. Elaboración y evaluación de un antisuero para la detección inmunohistoquímica del virus de la rabia en tejido cerebral fijado en aldehídos. *Biomédica*. 2010; 30(1):146-51
- 139- De Keyser J, Mostert JP, Koch MW. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci*. 2008;267:3-16.
- 140- Venugopal AK, Ghantasala SS, Selvan LD, Mahadevan A, Renuse S, Kumar P et al. Quantitative proteomics for identifying biomarkers for Rabies. *Clin Proteomics*. 2013;10(1):1-13.
- 141- Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T. Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins. *Arch Histol Cytol*. 1989;52:13-24.
- 142- Monroy-Gómez J, Santamaría G, Torres-Fernández O. Overexpression of MAP2 and NF-H Associated with Dendritic Pathology in the Spinal Cord of Mice Infected with Rabies Virus. *Viruses*. 2018. 10,112; doi:10.3390/v10030112
- 143- Molofsky A, Krenick R, Ullian E, Tsai H, Deneen B, Richardson W et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & development*. 2012;26:891–907.
- 144- Miyake T, Hattori T, Fukuda M, Kitamura T, Fujita S. Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. *Brain Res*. 1988;451(1-2):133-8.
- 145- Pekny M, Leveen P, Pekna M, Eliasson C, Berthold C, Westermarck B et al. Mice

lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *The EMBO Journal*. 1995;14:1590-1598.

- 146- Voskuhl R, Peterson R, Song B, Ao Y, Morales L, Tiwari-Woodruff S et al. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*. 2009;29:11511-22.
- 147- Szymocha R, Akaoka H, Dutuit M, Malcus C, Didier-Bazes M, Belin MF. Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *J Virol*. 2000;74:6433-6441.
- 148- Donati D, Martinelli E, Cassiani-Ingoni R, Ahlqvist J, Hou J, Major EO, Jacobson S. Variant-specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes. *J Virol*. 2005;79(15):9439-48.
- 149- Koyuncu O, Hogue J, Enquist L. Virus Infections in the Nervous System. *Cell Host Microbe*. 2013;13(4): 379-393.
- 150- Schweighardt B, Atwood W. Virus receptors in the human central nervous system. *J Neurovirol*. 2001;7(3):187-95.
- 151- Fletcher NF, Wilson GK, Murray J, Hu K, Lewis A, Reynolds GM et al. Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology*. 2012; 142(3):634-643.
- 152- Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1): 99-126.
- 153- Hamir AN, Niezgodka M, Rupprecht CE. Recovery from and clearance of rabies virus in a domestic ferret. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(2):248-51.
- 154- Zlotnik I, Grant D. The Relationship Between Immunity and the Pathology of the CNS of Mice Infected with the CVS Strain of Rabies. *Br J Exp Pathol*. 1973;54(5): 534-552.
- 155- Woodroffe M, Bunning A. Proteases and Peptidases in EAE. En: Ehud Lavi, Cris S. Constantinescu. *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. ed. Springer US; 2005. p. 391-413.
- 156- Fish KN, Depto AS, Moses AV, Britt W, Nelson JA. Growth kinetics of human cytomegalovirus are altered in monocyte-derived macrophages. *J Virol*. 1995;69:3737-3743.

- 157- Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol.* 1989;19:689-694.
- 158- Gendelman HE, Narayan O, Molineaux S, Clements JE, Ghotbi Z. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:7086-7090.
- 159- Feiden W, Kaiser E, Gerhard L, Dahme E, Gylstorff B, Wandeler A et al. Immunohistochemical staining of rabies virus antigen with monoclonal and polyclonal antibodies in paraffin tissue sections. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1988;35(4):247-55.
- 160- Sparrow JR. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system. *J Mol Neurosci.* 1995;5:219-229.
- 161- Schneider LG. The rabies pathogenesis in mice. II. Spread of virus in the CNS. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B].* 1969;153:1-13.
- 162- Van der Zijden JP, Van Eijsden P, De Graaf RA, Dijkhuizen RM. ¹H/¹³C MR spectroscopic imaging of regionally specific metabolic alterations after experimental stroke. *Brain.* 2008;131(Pt8):2209-19.
- 163- Yang ZJ, Xie Y, Bosco GM, Chen C, Camporesi EM. Hyperbaric oxygenation alleviates MCAO-induced brain injury and reduces hydroxyl radical formation and glutamate release. *Eur J Appl Physiol.* 2010;108(3):513-22.
- 164- Wang YF, Hatton GI. Astrocytic plasticity and patterned oxytocin neuronal activity: dynamic interactions. *J Neurosci.* 2009 Feb 11;29(6):1743-54.
- 165- Song D, Xu J, Hertz L, Peng L. Regulatory volume increase in astrocytes exposed to hypertonic medium requires β 1 -adrenergic Na⁽⁺⁾ /K⁽⁺⁾ -ATPase stimulation and glycogenolysis. *J Neurosci Res.* 2015 Jan;93(1):130-9.
- 166- Song Y, Gunnarson E. Potassium dependent regulation of astrocyte water permeability is mediated by cAMP signaling. *PLoS One.* 2012;7(4):e34936.
- 167- Scumpia P, Kelly K, Reeves W, Stevens B. Double-stranded RNA signals antiviral and inflammatory programs and dysfunctional glutamate transport in TLR3-expressing astrocytes. *Glia,* 2005;52(2):153-162.
- 168- Pixley SK, de Vellis J. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* 1984;317(2):201-9.

- 169- Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Karl J, Gonçalves CA et al. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 2000 Dec 15;486(3):203-7.
- 170- Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia.* 2008;12(4):198-204.
- 171- Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C et al. The many faces of S100B protein: when an extracellular factor inactivates its own receptor and activates another one. *Ital J Anat Embryol.* 2010;115(1-2):147-51.
- 172- Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(6):4037-42.
- 173- Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ et al. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure.* 2010;18(10):1342-52.
- 174- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:40096–40105.
- 175- Matsui T, Mori T, Tateishi N, Kagamiishi Y, Satoh S, Katsube N et al. Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: enhanced astrocytic synthesis of s-100beta in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(6):711-22.
- 176- Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC, Griffin WS. Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer`disease temporal lobe. *Neurobiol Aging.* 1992;13(1):1-7.
- 177- Fedoroff S, White R, Neal J, Subrahmanyam L, Kalnins I. Astrocyte cell lineage. II. Mouse fibrous astrocytes and reactive astrocytes in cultures have vimentin and GFP-containing intermediate filaments. *Brain Res.* 1983;283:303-15.
- 178- Chiu FC, Norton WT, Fields KL. The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J Neurochem.* 1981;37(1):147-55.
- 179- Dahl D, Bignami A, Weber K, Osborn M. Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration: localization of vimentin, the fibroblastic 100-A filament protein, in normal and reactive astrocytes. *Exp Neurol.* 1981;73(2):496-506.
- 180- Dellagi K, Tabilio A, Portier M, Vainchenker W, Castaigne S, Guichard J et al.

- Expression of Vimentin Intermediate Filament Cytoskeleton in Acute Nonlymphoblastic Leukemias. *Blood* 1985;65:1444-1452
- 181- Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol.* 1981 Aug;90(2):435-47.
- 182- Schmechel DE, Rakic P. Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature (Land.)*. 1979;277:303-305.
- 183- Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* 1986;374(1):110-8
- 184- Lee HH, Park SC, Choe IS, Kim Y, Ha YS. Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury. *Korean J Neurotrauma.* 2015;11(2):44-51.
- 185- Lempp C, Spitzbarth I, Puff C, Cana A, Kegler K, Techangamsuwan S et al. New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. 2014; 6(7): 2571–2601
- 186- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAPthirty- one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 2000; 25:1439-1451.
- 187- Pekny, M. and Pekna, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.* 2004;204:428-437.
- 188- Hutchins JB, Casagrande VA. Vimentin: changes in distribution during brain development. *Glia.* 1989;2(1):55-66.
- 189- Krohn K, Laping N, Morgan T, Finch C. Expression of vimentin increases in the hippocampus and cerebral cortex after entorhinal cortex lesioning and in response to transforming growth factor β 1. *J Neuroimmunol.* 1995;56:53-63
- 190- Sofroniew MV. Astrocyte failure as a cause of CNS dysfunction. *Mol Psychiatry.* 2000;5:230-232.
- 191- Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 2005;5:400-407.
- 192- García Morán G, Mejía Ó, Hernández Vela S, García Cardona A, Clavijo Grimaldi D, Baez S et al. Biomedicina (Biología, Patobiología, Bioclínica y Fármaco-Terapéutica) de la Familia de las proteínas S100 en la especie humana. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud,* 2006;38:126-152.

- 193- Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science*. 2002; 298:556-62.
- 194- Auld DS, Robitaille R. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron*. 2003;40:389-400.