

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la expresión de marcadores neuronales y la ultraestructura de motoneuronas en médula espinal de ratones

Jeison Alexander Monroy Gómez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias
Bogotá, Colombia
2017

Efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la expresión de marcadores neuronales y la ultraestructura de motoneuronas en médula espinal de ratones

Jeison Alexander Monroy Gómez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Neurociencias

Director:

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

Grupo de Morfología Celular

Instituto Nacional de Salud

Codirector:

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

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

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

2017

(Dedicatoria)

A mis padres por enseñarme que la perseverancia, dedicación y responsabilidad son las bases para alcanzar los objetivos

A mis hermanos, abuelos y demás familiares por hacer parte de mi vida y compartir momentos buenos y malos en este camino.

Agradecimientos

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

Al Doctor ORLANDO TORRES FERNÁNDEZ, Coordinador del Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud y director de este trabajo de grado, por su apoyo constante y orientación así como por las enseñanzas y consejos para afrontar el quehacer de un investigador.

A la Doctora ZULMA DUEÑAS GÓMEZ, codirectora de este trabajo, investigadora y Profesora Asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, por su orientación en el desarrollo de esta investigación y en la Maestría en Neurociencias

Al Biólogo GERARDO SANTAMARÍA ROMERO, por su colaboración en la experimentación con los animales y en las diferentes actividades de laboratorio.

Al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD por toda la colaboración brindada a través de sus directivos, instalaciones y personal involucrado en el desarrollo y financiación de este trabajo de investigación.

A todos los integrantes del GRUPO DE MORFOLOGÍA CELULAR del INS por su acogida desde hace 7 años y por sus aportes para mi formación profesional y personal.

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

A COLCIENCIAS por la financiación del proyecto “Estudio neuroanatómico de las dinámicas de infección celular en médula espinal y corteza cerebral en ratones inoculados con el virus de la rabia”, código: 21046574573, en el marco del cual fue financiado este trabajo y por su apoyo a través de dos convocatorias de Jóvenes Investigadores.

A la INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA ESCUELA COLOMBIANA DE REHABILITACIÓN, por permitir desempeñarme como docente del Departamento de Ciencias Básicas durante parte del desarrollo de este proyecto.

Resumen

La mayoría de estudios de los efectos del virus de la rabia en el sistema nervioso se han enfocado en el encéfalo. Pero, es la médula espinal, el componente del sistema nervioso central por donde generalmente ingresa el virus desde los nervios periféricos. El propósito de esta investigación fue estudiar el tejido infectado con el virus de la rabia, en la médula espinal de ratones, mediante el análisis de la distribución de los antígenos virales, la inmunorreactividad de marcadores neuronales y la ultraestructura de las células infectadas. Se inocularon ratones con virus de la rabia por vía intramuscular en las extremidades posteriores. Cuando los animales alcanzaron un estado avanzado de la enfermedad se extrajo la médula espinal y se cortó en rodajas transversales mediante el uso de un vibrátomo. En estos cortes se llevó a cabo el estudio inmunohistoquímico para detectar antígenos virales y para evaluar el efecto de la infección sobre la inmunorreactividad de la proteína nuclear neuronal (NeuN), la proteína asociada a microtúbulos (MAP2), la proteína de neurofilamento (NF) y los siguientes marcadores de neurotransmisores: GABA, glicina, GAD, transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) y colina-acetiltransferasa (ChAT). Algunos de los cortes fueron procesados para microscopía electrónica. Este estudio confirmó que la infección con el virus de la rabia genera patología dendrítica asociada al aumento en la expresión de proteínas del citoesqueleto neuronal, altera la síntesis de algunos neurotransmisores, y genera apoptosis en las neuronas del asta ventral de la médula espinal. Además, se estableció que la vía motora es la ruta de ingreso y dispersión del virus dentro de la médula espinal luego de inocularlo por la ruta intramuscular en las extremidades posteriores..

Palabras clave: Virus de rabia, médula espinal, marcadores neuronales, neurotransmisores, citoesqueleto, ultraestructura del sistema nervioso, apoptosis.

Abstract

Most studies of the effects of rabies virus on the nervous system have focused on the brain. But, it is the spinal cord, the component of the central nervous system through which the virus usually enters from the peripheral nerves. The purpose of this study was to study tissue infected with rabies virus in the spinal cord of mice by analyzing the distribution of viral antigens, immunoreactivity of neuronal markers and ultrastructure of infected cells. Rabies virus mice were inoculated intramuscularly into the hind limbs. When the animals reached an advanced stage of the disease, the spinal cord was removed and cut into transverse slices by the use of a vibratome. In these sections the immunohistochemical study was carried out to detect viral antigens and to evaluate the effect of the infection on the immunoreactivity of the neural nuclear protein (NeuN), microtubule-associated protein (MAP2), neurofilament protein (NF) and the following neurotransmitter markers: GABA, glycine, GAD, vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and choline acetyltransferase (ChAT). Some of the cuts were processed for electron microscopy. This study confirmed that infection with the rabies virus generates dendritic pathology associated with increased protein expression of the neuronal cytoskeleton, alters the synthesis of some neurotransmitters, and generates apoptosis in neurons of the ventral horn of the spinal cord. In addition, it was established that the motorway is the route of entry and dispersion of the virus into the spinal cord after inoculation by the intramuscular route in the hind limbs ..

Keywords: Rabies viurs, spinal cord, neuronal markers, neurotransmitters, cytoskeleton biochemistry, ultrastructure of the nervous system, apoptosis.

Contenido

	Pág.
Introducción	1
1. Marco teórico.....	3
1.1. Virus de la rabia.....	3
1.1.1. Estructura básica	3
1.1.2. Epidemiología.....	3
1.1.3. Mecanismos de infección del virus de la rabia	5
1.1.4. Manifestaciones clínicas	7
1.1.5. Diagnóstico.....	7
1.1.6. Patología	8
1.2. Médula espinal.	10
1.2.1. Estructura de la médula espinal.....	10
1.2.2. Sustancia Gris	11
1.2.3. Lámina VII	13
1.2.4. Lámina VIII	14
1.2.5. Lámina IX	15
1.3. Neurotransmisores.	16
1.3.1. GABA	16
1.3.2. Glicina	17
1.3.3. Acetilcolina (ACh)	18
1.4. Citoesqueleto neuronal.....	19
1.4.1. Microtúbulos	19
1.4.2. Neurofilamentos.....	20
1.5. El marcador neuronal NeuN	21
1.6. Antecedentes.....	21
1.6.1. Estudios sobre neurotransmisores y citoesqueleto en rabia	21
1.6.2. Rabia y médula espinal.....	23
2. Objetivos.....	24
2.1. General.	24
2.2. Específicos.....	24

3. Materiales y métodos.....	25
3.1. Manejo de animales e inóculo viral.	25
3.2. Infección viral, fijación y extracción de la médula espinal.....	26
3.3. Conservación de las muestras y delimitación del área de estudio.....	27
3.4. Estudio histológico (H&E).	28
3.5. Estudio inmunohistoquímico.	29
3.6. Estudio ultraestructural.	30
3.7. Método de Golgi Cox.	31
3.8. Análisis cualitativo y cuantitativo.	31
3.9. Consideraciones ambientales.	32
4. Resultados	34
4.1. Signos clínicos de la rabia en ratones.....	34
4.2. Distribución de la inmunorreactividad a NeuN y efecto de la infección con el virus de la rabia.	44
4.3. Distribución de la inmunorreactividad a MAP2 y NF-H y efecto de la infección con el virus de la rabia.....	46
4.4. Patología dendrítica en neuronas de la médula espinal de ratones infectados con rabia.	49
4.5. Efecto de la infección rábica sobre marcadores de neuronas colinérgicas, gabaérgicas y glicinérgicas.....	51
4.6. Ultraestructura.	56
4.7. Inmunohistoquímica para Bax.....	62
5. Discusión.....	63
5.1. Distribución de la Infección con el virus de la rabia en la médula espinal.....	63
5.2. Marcadores del citoesqueleto y patología dendrítica asociada a la infección con el virus de la rabia.	65
5.3. Efecto de la infección rábica sobre marcadores de neuronas colinérgicas, gabaérgicas y glicinérgicas.....	69
5.4. Muerte celular asociada a la infección con el virus de la rabia.	71
5.5. Efecto de la infección con virus de la rabia en la ultraestructura neuronal.	73
6. Conclusiones	75

A. Anexo: Protocolo de bioseguridad para la inoculación y manejo de ratones con el virus de la rabia	76
B. Anexo: Inmunohistoquímica para rabia.....	78
C. Anexo: Inmunohistoquímica para marcadores neuronales	80
D. Anexo: Prueba de normalidad (shapiro-wilks modificado)	82
E. Anexo: Prueba T para observaciones apareadas	83
F. Anexo: Prueba de Wilcoxon para muestras independientes	84
Bibliografía.	85

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1: <i>Diagrama de la distribución de las láminas de Rexed en la médula espinal de ratones</i>	28
Figura 4-1: Valores del peso en gramos, durante las primeras 120 horas postinoculación, en el grupo de ratones control y en el grupo de animales inoculados con rabia	35
Figura 4-2: Signos clínicos en ratones inoculados con el virus de la rabia.	36
Figura 4-3: Secuencia de aparición de antígenos y neuronas inmunorreactivas al virus de la rabia en cortes transversales de médula lumbar de ratón.	39
Figura 4-4: Ascenso y dispersión del virus de la rabia en los niveles torácico y cervical.	40
Figura 4-5: Representación gráfica de la diseminación del virus de la rabia en la médula espinal de ratón.	41
Figura 4-6: Descripción de las vías de ascenso del virus de la rabia, por transporte retrógrado, desde la médula lumbar hasta la médula cervical.	42
Figura 4-7: Coloración H & E en médula espinal de ratón normal e infectado con rabia.	43
Figura 4-8: Efecto del virus sobre la expresión del NeuN	44
Figura 4-9: Inmunorreactividad de MAP2 en la médula espinal de ratones. Participación de las energías renovables primaria	47
Figura 4-10: Inmunorreactividad de NF-H en la médula espinal de ratones.	48
Figura 4-11: Técnica de Golgi Cox en muestras control e infectas.	50
Figura 4-12: Efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la expresión de marcadores de neuronas colinérgicas	52
Figura 4-13: Efecto de la infección con virus de la rabia sobre la inmunorreactividad de GABA, glicina y GAD en el asta ventral.	54
Figura 4-14: Imágenes de la ultraestructura de la médula espinal en ratones control. .	57

Figura 4-15: Ultraestructura de la médula espinal en ratones infectados con virus CVS	58
Figura 4-16: Ultraestructura de neuronas apoptóticas en médula espinal de ratones infectados con virus CVS.	59
Figura 4-17: Imágenes ultraestructurales de la médula espinal en ratones infectados con virus 'calle'	60
Figura 4-18: Ultraestructura figuras semejantes a mielina en la médula espinal de ratones infectados con virus CVS.	61
Figura 4-19: Inmunohistoquímica para Bax en ratones inoculados con virus CVS.....	62

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1: Conteo de neuronas NeuN+ en muestras control e infectadas	45
Tabla 4-2: Densitometría óptica de la inmunorreactividad a NeuN en muestras control e infectadas.	45
Tabla 4-3: Densitometría óptica de la inmunorreactividad a MAP2 y NF-H en muestras control e infectadas.	49
Tabla 4-4: Datos de densitometría óptica de la inmunorreactividad para marcadores de neuronas colinérgicas	53
Tabla 4-5: Densitometría óptica de la inmunorreactividad para marcadores de neuronas GABAérgicas y glicinérgicas	55

Introducción

La rabia es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial; la mayoría de víctimas fatales se presenta en África y Asia especialmente en países como la India. En Latinoamérica el número de casos ha disminuido pero la rabia sigue siendo considerada una zoonosis de importancia en salud pública. Anualmente en el mundo mueren unas 55 mil personas y están en riesgo de contraer la enfermedad más de 3 millones. En la actualidad la rabia es considerada una enfermedad desatendida que causa graves cargas sociales y económicas en los países donde está presente (1,2). En Colombia se ha evidenciado un incremento de la exposición rábica (contacto con posibles vectores); en el 2007 fue del 8,7 % y en el 2011 del 31,5 %. Por esta razón es necesario enfocar las actividades de control hacia los grupos con mayor riesgo y vulnerabilidad a las exposiciones rábicas (3). Sin embargo, además de trabajar en la prevención también es necesario continuar en la tarea de investigar para hallar alternativas terapéuticas que pueden curar la enfermedad (4).

Aunque las estrategias de prevención y control de la rabia están bien descritas, existen una serie de obstáculos que impiden la eliminación de esta enfermedad en el mundo, entre ellos, la ausencia de instalaciones de diagnóstico, la deficiencia de sistemas de vigilancia y el acceso limitado a las vacunas modernas (1). A esto se debe agregar la heterogeneidad de los síntomas, el diagnóstico diferencial con otras enfermedades del sistema nervioso y el creciente aumento de la población humana en zonas donde están presentes los vectores silvestres (2).

Por otra parte, se ha avanzado muy poco en la investigación para curar esta enfermedad, que aunque es 100% prevenible mediante la vacunación de personas y animales, cuando se presenta es mortal (5). Una alternativa para impedir la muerte hasta ahora inevitable de los pacientes, es frenar la diseminación del virus en el sistema nervioso para su posterior eliminación. Se ha propuesto un tratamiento basado en la inducción del coma en los pacientes afectados y el uso posterior de antivirales (6), pero ha sido cuestionado por la

falta de fundamentación científica y sus pobres resultados (4,7,8). Se requiere incrementar la investigación para desarrollar terapias curativas. Para lograrlo es necesaria una mejor comprensión de los mecanismos básicos implicados en la patogénesis de la rabia (9); a pesar de años de investigación, los mecanismos de disfunción del sistema nervioso en rabia siguen siendo poco claros (10).

Por estas razones esta investigación tuvo como objetivo estudiar el tejido infectado con el virus de la rabia en la médula espinal de ratones mediante el análisis de la distribución de los antígenos virales, la inmunorreactividad de marcadores neuronales y la ultraestructura de las células infectadas. Para cumplir este propósito se realizó el estudio inmunohistoquímico de marcadores de neurotransmisores, proteínas de citoesqueleto, proteína NeuN y apoptosis. También se evaluó la patología dendrítica por el método de Golgi Cox y la ultraestructura neuronal por microscopía electrónica de transmisión.

Este trabajo es una contribución al conocimiento del efecto de la infección con virus de la rabia en los sistemas de neurotransmisión, el citoesqueleto neuronal, y los procesos de muerte celular. Estos resultados aportan información importante para el entendimiento de los procesos fisiopatológicos de la rabia.

.

1. Marco teórico

1.1. Virus de la rabia.

1.1.1. Estructura básica

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae*. La partícula viral tiene forma de bala, es mucho más grande que la mayoría de virus y mide unos 75 x 180 nm. Es un virus de genoma ARN negativo el cual codifica las siguientes proteínas: la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, proteína de matriz M, la glicoproteína (G), y una ARN polimerasa viral (L). Estas proteínas están organizadas en una nucleocápside ribonucleoproteica (virus ARN) rodeada por una envoltura lipoproteica (11). Las proteínas L y P están asociados con la estructura de ribonucleoproteína helicoidal. La nucleoproteína juega un papel en la replicación y transcripción (11), mientras la glicoproteína G es la responsable de la invasión al sistema nervioso mediante la adhesión del virus a receptores celulares (12).

1.1.2. Epidemiología

La rabia está distribuida por todo el mundo excepto en la Antártida; las tasas de mortalidad más altas se presentan en países asiáticos y africanos (2). En América Latina los casos de rabia han disminuido en las últimas décadas debido a las campañas de prevención contra la rabia canina. La mortalidad se estima en 0.01-0.60 por cada 100.000 individuos, siendo Brasil, Perú, México y Colombia los países con mayor número de casos de rabia humana en la región (13). Actualmente, el comportamiento epidemiológico de la rabia animal en Colombia es bien conocido. La región Caribe es clasificada de "riesgo alto", lo que significa

que hay registro de casos humanos o animales, o se presenta la enfermedad en departamentos vecinos o en territorios de otros países (14). En Colombia se ha demostrado que los focos de rabia silvestre (que afectan principalmente el ganado) están presentes en 31 de los 32 departamentos del país siendo las épocas secas donde se presenta mayor incidencia de casos (15). El perro es el principal vector de rabia en el mundo, sin embargo, los casos de rabia humana transmitida por perros han disminuido en un 95% debido a los programas de prevención y control. En los lugares donde la rabia canina está bajo control, los vectores silvestres son los causales de mantener y transmitir la enfermedad (13).

Los murciélagos son reservorios de diferentes especies de *Lyssavirus* alrededor del mundo y son el principal reservorio del virus de la rabia en el continente americano (16). Desde el 2004 se reportan más casos de rabia transmitida por vectores silvestres especialmente murciélagos que los transmitidos por perros (13,17). Entre el 2010 y 2013 se reportaron un total de 111 casos de rabia humana en países de Latinoamérica y el Caribe; 40 de ellos transmitida por perros y 63 por murciélagos (16). En Latinoamérica el principal transmisor silvestre del virus de la rabia a animales domésticos y humanos es el murciélago hematófago (vampiro) *Desmodus rotundus*. Además, las actividades humanas han modificado el ambiente de tal manera que hay un aumento de las posibilidades de contacto con esta y otras especies portadoras y, en consecuencia, el aumento de los casos de rabia de origen silvestre (17).

No existe un tratamiento para curar la rabia una vez aparecen los síntomas. Las medidas de profilaxis post-exposición comprenden la vacunación y la inmunización pasiva con inmunoglobulina antirrábica humana, la cual se inyecta en el área de la mordedura porque ataca al virus y pueden frenar o detener la progresión viral (11). Sin embargo, existen inconvenientes tales como la distribución inequitativa de las vacunas y las inmunoglobulinas (18), inclusive, estas pueden no estar disponibles en muchos países de Asia y África (19).

Una alternativa para reducir la incidencia de la rabia, podría ser la masificación del tratamiento pre-exposición (vacunación) pero los altos costos de la vacuna impiden la

inmunización masiva (18). Además existe disparidad en los protocolos de inmunización en cuanto al número de dosis, la vía de inoculación y la cantidad utilizada (19). Por estas razones el tratamiento se ha restringido a las medidas profilácticas realizadas después del contacto con un animal infectado (1).

1.1.3. Mecanismos de infección del virus de la rabia

La infección con el virus de la rabia generalmente es causada por el contacto (mordedura o arañazo) con un animal infectado especialmente en las extremidades. La transmisión humano-humano es accidental y se ha reportado principalmente en trasplantes (20). Otros mecanismos de infección pueden ser: la inhalación de aerosoles con el virus (ej: en cuevas de murciélagos), la contaminación con una herida abierta y contactos de la mucosa con saliva o muestras infectadas (21). El periodo de incubación de la enfermedad en humanos es de 20 a 60 días, pero en ocasiones se han reportado casos superiores a 1 año (22); estos largos períodos de incubación son probablemente causados por la inoculación de una baja cantidad de partículas virales y/o por la existencia de mecanismos de silenciamiento endógeno de RNA o microRNAs (miRNAs) que ralentizan la replicación viral en el músculo (23).

La entrada del virus por la ruta motora (no en las terminaciones sensoriales o autonómicas) se determina por la presencia del receptor nicotínico de la acetilcolina en la unión neuromuscular, mediada por la glicoproteína del virus que tiene un papel importante en la unión con estos receptores (12). También se ha demostrado la capacidad del virus de la rabia de la variante de murciélago de pelo plateado de replicarse en células epidérmicas in vitro (24). Esto sugiere la posibilidad de ingreso por vía sensorial o inervación simpática de la piel, pero hasta ahora este mecanismo está en discusión (21). Gabriella Ugolini, quien por muchos años ha estudiado los mecanismos de transporte del virus de la rabia y su uso como trazador neuronal sostiene que sólo está demostrado el transporte axonal retrógrado de las partículas virales a través de la vía motora (25). Recientemente se publicó un estudio donde los autores inocularon virus a través de la almohadilla plantar de ratones y luego lo detectaron en células sensoriales del ganglio de la raíz dorsal y de la médula espinal (26). Ellos proponen que la vía de ingreso del virus (sensorial o motora) depende del sitio de

inoculación. En los músculos por lo general el virus no estimula una respuesta inmunológica pero es susceptible a la neutralización si existen anticuerpos (22). Una vez el virus ingresa, la proteína P interactúa con las moléculas de la cadena de dineína; sin embargo, algunos estudios han demostrado que no es un mecanismo esencial para el transporte de virus. Posteriormente el virus se transporta en compartimentos membranales similares a los factores neurotróficos y es poco probable que esté libre en el citoplasma (27).

Uno de los mecanismos que se propone para el transporte del virus de la rabia por vía retrógrada en el axón es unirse a los receptores p75^{NTR} que facilitan la internalización del virus por la vía p75. Esta vía aumenta las tasas de transporte debido a que realiza menos detecciones llegando de manera más eficiente al cuerpo celular. Esto es posible puesto que p75 parece activar diferentes cascadas de señalización y como resultado de la unión de varios ligandos distintos o interacciones con diversos co-receptores que regulan a la alta el transporte axonal retrógrado (27).

La idea más aceptada es que el virus de la rabia en condiciones naturales se disemina exclusivamente por transporte axonal retrógrado y sólo a través de los contactos sinápticos. Estas características lo han hecho un excelente trazador neuronal (25). Sin embargo, en estudios donde se usó la infección de ratones DRG con virus de la rabia atenuado (SAD-B19) deficiente de la glicoproteína (G) se ha logrado establecer la posibilidad del transporte anterógrado. Se especula que el virus tiene la capacidad de ser transportado activamente a lo largo de microtúbulos y es capaz de interactuar con miembros de la familia de las dineínas. Este mecanismo es usado por otros tipos de virus como los del Herpes para permitirle transporte bidireccional. Esto sugiere que el transporte del virus de la rabia puede ser mediado por diferencias moleculares en la dinámica del citoesqueleto dentro de las neuronas sensoriales (28). Algunos resultados indican que en el transporte retrógrado el virus de la rabia es transferido a través de las sinapsis axo-dendríticas y/o axo-somáticas a las neuronas motoras; sin embargo, las sinapsis axo-axónicas también parecen ser un sustrato para la transferencia del virus de la rabia de forma anterógrada pero sólo con virus desprovisto de proteína G (28).

1.1.4. Manifestaciones clínicas

Las infecciones con el virus de la rabia resultan en dos tipos de manifestaciones. La rabia furiosa caracterizada por cambios en el comportamiento, fluctuaciones en la conciencia, cambios en el estado mental de los pacientes, fobias y problemas respiratorios. En la rabia parálitica se presenta parálisis motora similar al síndrome de Guillain-Barré. En ambos casos los pacientes presentan coma y posteriormente la muerte (21,29). La proporción entre los dos tipos de rabia es de 3:1 y el tiempo de supervivencia de los pacientes es menor cuando se presenta la rabia furiosa. Se ha demostrado mayor presencia de antígenos de rabia en la médula espinal, el troco encefálico y la corteza cerebral en la rabia furiosa (29). Por otra parte, en la rabia parálitica se ha encontrado un aumento de la reacción inflamatoria mediada por células T en el tronco encefálico (29). Los autores sugieren que este evento podría retardar la propagación del virus al resto del encéfalo disminuyendo la carga viral, razón por la cual los tiempos de supervivencia son mayores en la rabia parálitica y la concentración de antígenos es mayor en el encéfalo en la rabia furiosa.

1.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección con el virus de la rabia hace parte de las recomendaciones de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) para la prevención y control de la enfermedad. La confirmación se realiza post mórtem mediante pruebas de laboratorio en tejido nervioso extraído de personas o animales muertos. En algunos casos las pruebas no se realizan debido a creencias culturales o religiosas lo que conlleva a un sub-registro de la enfermedad (30). El diagnóstico pre-mortem y post-mortem del virus de la rabia está sujeto a ciertas limitaciones. Los recientes avances moleculares tienden a complementar los enfoques convencionales potenciando la resolución diagnóstica de la rabia (31)

La prueba 'estándar de oro' para el diagnóstico de la rabia es el test de inmunofluorescencia directa que identifica proteínas de la nucleocápside del virus y entrega resultados en pocas horas en un 95-99% de los casos. Sin embargo, la precisión de la prueba es dependiente de la calidad del tejido. Este debe ser tejido fresco. En las

regiones donde los sistemas de salud son insuficientes y las vías de acceso son pocas o precarias los cadáveres presentan problemas de descomposición, generando diagnóstico de falsos negativos cuando se usa la prueba de inmunofluorescencia (30,31). Por esta razón se ha recomendado el uso de pruebas de PCR de ARN viral que han demostrado una mayor robustez. Algunos estudios han demostrado la detección del ARN viral en tejido extraído de cerebros después de 70 días post mortem. El uso de RT-PCR se ha sugerido como prueba de apoyo en el diagnóstico de la rabia (30). Sin embargo, existen barreras financieras y logísticas que impiden el uso rutinario de ensayos moleculares de diagnóstico (31). Otra de las pruebas confirmatorias de la enfermedad es la inoculación intracerebral en ratones lactantes con material infectado. Esta prueba ha demostrado una gran sensibilidad cuando la muestra está en buenas condiciones; no obstante, el tiempo de resolución es muy largo (28 días) (31).

En ocasiones es necesario llevar a cabo el diagnóstico con tejido cerebral sometido a fijación con aldehídos, especialmente cuando no se tienen indicios que hagan pensar en la rabia o si se tienen dificultades con el transporte de las muestras en fresco (32). Con este tipo de muestras tradicionalmente el diagnóstico de la rabia se realizaba mediante pruebas histológicas convencionales como la hematoxilina y eosina (H&E) donde se describe la presencia de cuerpos de Negri. Sin embargo, este diagnóstico presenta limitaciones porque requiere gran experiencia del patólogo y el cuerpo de Negri no siempre está presente en el tejido infectado (31,33,34) Debido a estas consideraciones el diagnóstico de rutina en laboratorios de patología se complementa con la técnica inmunohistoquímica que tiene mayor especificidad debido a que usa anticuerpos para la detección de antígenos específicos del virus de la rabia (31,34)

1.1.6. Patología

Macroscópicamente el examen de encéfalos infectados con el virus de la rabia presenta alteraciones relativamente insignificantes o no específicas. A veces se reporta una leve inflamación cerebral, congestión de las leptomeninges y los vasos sanguíneos del parénquima (35). A nivel histopatológico no se evidencian cambios importantes en el tejido nervioso. El virus infecta casi exclusivamente a las neuronas en donde forma inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas (cuerpos de Negri) que se consideran el rasgo

patognomónico de la rabia, pero no están presentes en todos los casos. Estas inclusiones pueden ser apenas perceptibles o estar ausentes entre un 20 y 60% de las muestras infectadas con el virus de la rabia (33,34).

En algunos modelos animales se ha asociado la infección rábica con diferentes grados de disolución de los cuerpos de Nissl, degeneración vacuolar del neuropilo y ruptura nuclear ocasional (10). En la corteza cerebral, en el hipocampo y el cerebelo de ratones se ha observado presencia de actividad microglial e infiltración de células inflamatorias mononucleares (10,36), pero el daño neuronal causado por el virus de la rabia no es originado por la infiltración de linfocitos y la activación de la microglia (10,36). Los estudios de microscopía electrónica se han enfocado más a la localización de las partículas virales, sin embargo, han revelado vacuolización del citoplasma y edema intracelular que se extiende a las dendritas (10,37). Recientemente, en nuestro laboratorio, hemos hallado degradación de los microtúbulos así como la presencia de figuras de mielina en las dendritas de las células piramidales de la corteza cerebral de ratón en correlación con patología dendrítica (38,39,40).

Se considera que el virus de la rabia no genera muerte celular (41). Esporádicamente ocurre picnosis o necrosis neuronal (34,35,42). La apoptosis podría ser un factor protector de la infección (10) pero no es considerada importante en rabia en condiciones naturales (41,43). No obstante, estudios con virus CVS han reportado la presencia de apoptosis en las células del encéfalo de ratones lactantes o recién destetados, especialmente cuando la inoculación es intracerebral (36,43,44). Los hallazgos neuropatológicos leves y la poca presencia de apoptosis, sugieren que la disfunción neuronal, en lugar de la muerte neuronal, es probablemente la responsable de la enfermedad clínica y el resultado fatal en la rabia (45). No obstante, la patología dendrítica demostrada con la técnica de Golgi es evidencia de que sí puede haber daño neuronal estructural (39,46)

1.2. Médula espinal.

La médula espinal forma parte del sistema nervioso central y presenta una compartimentación de los distintos tipos de áreas funcionales (sensitivas, motoras, autonómicas) similares a las del encéfalo. Transmite la información sensitiva desde las extremidades superiores, tronco, extremidades inferiores y desde la mayoría de las vísceras. Además, contiene fibras y células que controlan a los elementos motores que se encuentran en esas mismas estructuras (47,48). La médula espinal durante el desarrollo presenta una serie de segmentaciones pero en el adulto es continua y cilíndrica. Está compuesta por un centro interior de sustancia gris rodeado por una cobertura exterior de sustancia blanca. Está protegida por las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre) y el líquido cefalorraquídeo subaracnoideo y se encuentra en el interior del canal espinal, adaptándose a todas las curvas de la columna vertebral, sin entrar en contacto con la superficie ósea (47,48).

1.2.1. Estructura de la médula espinal

La médula espinal se deriva de la porción caudal de la placa neural embrionaria y de la eminencia caudal. La placa neural da origen a los segmentos cervical, torácico, y lumbar, mientras que la eminencia caudal da origen a los segmentos sacros y coccígeos. La médula espinal humana se extiende desde el foramen magno hasta la primera o segunda vértebra lumbar. Está conformada por 31 segmentos: 8 segmentos cervicales (C1-C8), 12 segmentos torácicos (T1-T12), 5 segmentos lumbares (L1-L5) 5 segmentos sacros (S1-S5) y 1 segmento coccígeo (Co1) (48). En rata y ratón se ha determinado la presencia de 34 fracciones distribuidas en 8 segmentos cervicales (C1-C8), 13 torácicos (T1-T13), 6 lumbares (L1-L6), 4 sacros (S1-S4) y 3 coccígeos (Co1-Co3) (47,49). La longitud de la médula espinal es inferior a la de la columna vertebral y en general ocupa los dos tercios superiores del canal vertebral; en humanos la terminación caudal de la médula espinal por lo general puede estar a la altura de la vértebra L1 o L2 y en rata a la altura de la L3 (47). De la médula espinal se desprenden los nervios espinales; a nivel cervical abandonan el canal vertebral a través de los agujeros intervertebrales arriba de la vértebra correspondiente. El octavo nervio cervical pasa a través del agujero entre la séptima

vértebra cervical y la primera vértebra torácica; esto se debe a que hay 8 segmentos cervicales en la médula y sólo 7 segmentos cervicales en la columna vertebral. Desde este punto los nervios espinales salen del canal a través de los agujeros que se encuentran inmediatamente debajo de la vértebra correspondiente (47).

Los nervios espinales están formados de la unión de las proyecciones de la raíz dorsal y raíz ventral de la médula espinal. Después de que las raíces dorsales y ventrales se transforman en el nervio espinal, este sale de la columna vertebral, para luego bifurcarse en sus ramas primarias dorsal y ventral. Las raíces espinales a su vez están formadas por un conjunto de raicillas que se van expandiendo a medida que se acercan a la raíz llegando a abarcar la totalidad de su segmento medular. En la rata la médula espinal posee alrededor de 15 raicillas dorsales y 15 raicillas ventrales en cada lado; en humanos solo de 6 a 8 raicillas dorsales y ventrales (47). Las raicillas dorsales están conjuntamente agrupadas a la raíz dorsal y las raicillas ventrales están atadas a la raíz ventral. Esta especialización es fundamental para entender las diferencias funcionales entre la raíz dorsal y la raíz ventral de la médula espinal. Se ha demostrado que la raíz dorsal está conformada por fibras sensoriales y recibe aferencias de la piel, subcutáneas, tejidos profundos y las vísceras; puede haber unas pocas fibras eferentes (rata). La raíz ventral está constituida por fibras somáticas (motoras) eferentes y fibras autonómicas presinápticas. La longitud y oblicuidad de las raíces aumenta progresivamente en dirección rostrocaudal porque aumenta la distancia entre los segmentos de la médula espinal y el correspondiente segmento vertebral. Las raíces lumbosacras son necesariamente más larga y constituyen la cauda equina o cola de caballo que llega a nivel de la S2 (47).

1.2.2. Sustancia Gris

En un corte transversal de la médula espinal, la sustancia gris es muy similar a una H o silueta de mariposa. Se puede dividir en asta posterior (dorsal) y asta anterior (ventral) con una región intermedia en el medio de estas dos. Las columnas (astas) anterior y posterior están unidas por una pequeña comisura gris que contiene un estrecho conducto central. El volumen de sustancia gris presente en cualquier nivel de la médula está relacionado con el número de músculos y otras estructuras inervadas en el nivel respectivo. Su tamaño es

máximo en la intumescencia medular cervical y lumbosacra, que inervan los músculos de los miembros superiores e inferiores respectivamente (47,48). La sustancia gris de la médula espinal se compone de los somas neuronales, las dendritas, la parte proximal del axón, las terminales axónicas de las fibras que hacen sinapsis en esta zona y las células gliales (47). Las neuronas en su mayor parte son de tipo multipolar y de gran tamaño. También existen interneuronas las cuales predominan en el asta dorsal y en la zona intermedia aunque también se pueden encontrar en el asta ventral (47,50).

En cortes transversales de médula se puede realizar una representación esquemática laminar de los núcleos neuronales especialmente los del cuerno dorsal. Se identifican diez láminas neuronales en la médula espinal. El esquema de laminación concuerda bien con los sitios conocidos de origen y terminación de las fibras aferentes y eferentes, lo que hace posible atribuir funciones por lo menos a ciertos grupos de células de la médula espinal. Este esquema es conocido como "*láminas de Rexed*". En resumen las láminas del I al IV son la principal región receptora cutánea; la lámina V recibe aferencias desde las vísceras, piel y músculos; la lámina VI aferentes mayormente propioceptivos y algunos cutáneos; la lámina VII contiene interneuronas que se comunican con las motoneuronas y los axones de la lámina VII se proyectan a las láminas VII y IX en dirección tanto ipsilateral como contralateral en los mismos niveles segmentarios cercanos. La lámina IX está compuesta por neuronas motoras cuyos axones salen de la médula espinal por las raíces ventrales para inervar las fibras musculares estriadas. Por último, la lámina X rodea el canal central, se compone de axones decusados, neuroglia y algunas células que tienen propiedades funcionales de interneuronas (47,49).

Debido al enfoque de este estudio, a continuación se profundizará en las láminas más relacionadas con la función motora, esencialmente en las láminas VII, VIII y IX del asta ventral de la médula espinal.

1.2.3. Lámina VII

Corresponde a una extensa área de sustancia gris que ocupa el territorio entre el cuerno dorsal y el cuerno ventral, así como una gran parte del espacio situado dentro del cuerno ventral. Las células de esta lámina son mayormente medianas y se distribuyen de manera homogénea en toda la lámina; sin embargo, existen algunas neuronas grandes en forma de estrella o redondeadas que asemejan motoneuronas. En general la lámina VII está conformada por células triangulares, multipolares y fusiformes. En humanos esta lámina se caracteriza por células con dendritas que se extienden principalmente en el plano mediolateral; estas dendritas pueden extenderse a lo ancho de la sustancia gris. En rata se ven neuronas pequeñas con cortos árboles dendríticos escasamente ramificados (47,50).

La lámina VII es blanco de áreas encefálicas involucradas en la función motora. La corteza motora, el núcleo rojo y la sustancia gris periacueductal proyectan a las interneuronas de la lámina VII. Además recibe aferencias principalmente de los músculos y las articulaciones y a nivel torácico también recibe aferencias de las vísceras. En su mayoría las células de la lámina VII son interneuronas premotoras que proyectan hacia las células motoras de la lámina IX. También presenta proyecciones supraespinales hacia la amígdala, hipotálamo, cerebelo, colículo superior contralateral, núcleo parabranquial, sustancia gris periacueductal y formación reticular pontomedular (51). Neuroquímicamente en los cuerpos celulares de la lámina VII se ha descrito marcación para calbindina, calretinina, parvalbúmina, encefalina, GABA, glicina y óxido nítrico (47). Por lo general es considerada que la función de la lámina VII es la de regular el movimiento y la postura por medio de la conexión de las interneuronas con las motoneuronas. Las interneuronas que interactúan con las neuronas motoras que inervan la musculatura del tronco están situadas en la región medial de la lámina, mientras las interneuronas que conectan con las motoneuronas que inervan a la musculatura de las extremidades se sitúan en su mayoría en la región lateral de esta lámina (47,50).

1.2.4. Lámina VIII

La lámina VIII varía en su forma y tamaño dependiente del nivel de la médula espinal. A nivel cervical y torácico se ubica en la base medial del cuerno ventral, en los otros niveles se extiende a través de toda la base del cuerno ventral. Las células de esta lámina varían en forma y tamaño; existen células que se asemejan a motoneuronas, y otras en forma de huso. La mayoría de las células en la lámina VIII tienen arboles dendríticos que se orientan dorsoventralmente. Las dendritas dorsales son proyectadas a la lámina VII y/o la comisura ventral y las ramas ventrales se dirigen hacia la punta ventromedial del asta ventral. Las arborizaciones ventral y medial por lo general son simétricas con solo una pequeña propagación ventrolateral (51).

La mayoría de las neuronas de la lámina VIII no proyectan a regiones supraespinales. Los axones se proyectan de forma ipsilateral o contralateral a las láminas VII-IX. Otros axones ascienden o descienden en la sustancia gris inmediatamente adyacente. La mayoría de las células de la lámina VIII son interneuronas o neuronas propioespinales. Se ha demostrado que algunas células de la lámina VIII se proyectan a la región contralateral del cerebelo, la región dorsal del núcleo reticular del bulbo raquídeo, la formación pontomedular reticular y el tálamo (51). Se conocen pocos datos de la quimioarquitectura de las células de la lámina VIII. Generalmente se ha demostrado que la mayoría de las células son de tipo GABAérgico y algunas pocas células contienen óxido nítrico, calbindina y parvoalbúmina (47). La lámina VIII juega un papel fundamental en la coordinación de movimientos y la coordinación de la actividad locomotora en los dos lados del cuerpo. Probablemente mediante la acción refleja cruzada y/o la acción sináptica descendente cruzada con las motoneuronas. Además, la mayoría de las neuronas a nivel cervical y lumbar que tienen largas conexiones supraespinales está en la lámina VIII, y presentan función de coordinación de movimientos de las extremidades superiores (51).

1.2.5. Lámina IX

La lámina IX se localiza en la base de la raíz ventral; está compuesta de motoneuronas y por lo general se pueden dividir en dos grupos funcionales. Un grupo somático de motoneuronas que inervan el esqueleto o músculos voluntarios y otro grupo visceral donde la inervación de las motoneuronas se dirige a los músculos lisos y las glándulas viscerales. Las principales células de esta lámina son las α -motoneuronas que presentan forma de estrella y son las más grandes de la médula espinal; los axones de estas neuronas inervan los músculos estriados. Las γ -motoneuronas son más pequeñas en comparación a las α -motoneuronas; estas neuronas inervan elementos contráctiles de los husos neuromusculares. Los axones de las α y γ motoneuronas salen a través de la raíz ventral (47,50). En la lámina IX también se encuentran neuronas pequeñas que superan en cantidad a las neuronas motoras. Los axones de estas neuronas se extienden por distancias considerables hacia arriba y abajo de la médula espinal en el fascículo propio adyacente a la sustancia gris (48).

La lámina IX tiene un patrón general de organización de tal modo que las columnas mediales inervan a la musculatura axial y las laterales, presentes en los engrosamientos cervical y lumbar, inervan a los músculos de las extremidades. Las motoneuronas dorsolaterales del asta ventral de cada columna inervan a la musculatura flexora y las ventrales a la musculatura extensora. Las columnas dorsomedial y ventromedial (axiales) están a lo largo de toda la médula, mientras que las columnas ventrolateral (brazo o muslo), dorsolateral (antebrazo o pierna) y retrodorsolateral (mano o pie), aparecen sólo en los engrosamientos. En la médula cervical (C3-C5) y lumbosacra (L4-S4) existe una columna central que inerva al músculo diafragma y al diafragma pélvico, respectivamente. En rata las dendritas de las neuronas motoras se extienden en el plano rostrocaudal, mediolateral y dorsoventral hacia adentro de las láminas VII-IX. Las motoneuronas en el asta ventral son colinérgicas (49), sin embargo, se ha logrado identificar motoneuronas con otras sustancias transmisoras como la dopamina (47).

1.3. Neurotransmisores.

Los neurotransmisores son sustancias químicas que ejercen su acción sobre la actividad eléctrica de las neuronas después de la interacción con los receptores de las superficies celulares como parte esencial de la comunicación neuronal. Para definir si una sustancia química debe ser catalogada como neurotransmisor se deben tener en cuenta los siguientes criterios: *Síntesis*: la sustancia debe ser sintetizada en la neurona presináptica. *Localización*: la sustancia debe localizarse dentro del botón presináptico de la sinapsis y ejercer un efecto sobre la neurona postsináptica. *Liberación*: la liberación debe ser desde el botón presináptico después de la estimulación o despolarización de la neurona. *Remoción*: por lo general existe un mecanismo de remoción del neurotransmisor en la hendidura sináptica. *Identidad de acción*: cuando es administrado de manera exógena en concentraciones razonables imita la acción de la liberación endógena (52,53). En el sistema nervioso central se han descrito diferentes sustancias que cumplen los criterios de un neurotransmisor. Por esta razón, se han agrupado en diferentes grupos según su composición química. Los *aminoácidos*: ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina, aspartato y glutamato. Las *aminas biógenas*: dopamina, epinefrina, norepinefrina, serotonina, melatonina e histamina. Otros neurotransmisores importantes son el acetilcolina y los neuropéptidos. El ATP y la adenosina conforman el grupo de los *nucleótidos y nucleósidos*. El óxido nítrico, una sustancia gaseosa, también se considera neurotransmisor (52,53).

1.3.1. GABA

El GABA es considerado el mayor neurotransmisor inhibitorio del SNC en mamíferos. La presencia de GABA en las interneuronas de la médula espinal contribuye a la modulación del equilibrio entre el tono excitador e inhibitorio en la transmisión sináptica. Las alteraciones de la función de este neurotransmisor en humanos están relacionadas con desórdenes tales como la hiperexcitabilidad (convulsiones), retardo mental, epilepsia, alteraciones del sueño, dependencia a drogas especialmente alcohol, desórdenes de coordinación, disquinesia, enfermedad de Huntington y Parkinson (54). El GABA se encuentra en muchas de las células de la médula espinal. En el asta ventral, la interacción de las

motoneuronas con las interneuronas (GABAérgicas) es muy importante en los procesos de locomoción (55).

En estudios realizados en ratas con la enzima ácido glutámico descarboxilaza (GAD) (que interviene en la síntesis de GABA) se ha demostrado la presencia de células que expresan esta enzima en casi todas las láminas de la médula espinal incluyendo al funículo dorsolateral. No se ha reportado presencia de células GAD positivas en la lámina IX aunque sí algunas proyecciones correspondiente a las interneuronas que expresan GAD (56). En la lámina VII se observan la mayoría de las células GAD positivas y algunas de ellas tienen estrecha comunicación con las motoneuronas al borde de la lámina IX. Las neuronas positivas a GAD en la lámina VII se caracterizan por tener formas irregulares, presentar agrupaciones de 3 o 4 neuronas y ser de tamaño mediano (56). Existe evidencia de la presencia de GABA y glicina como neurotransmisores inhibitorios de estas células (51). En la lámina VIII las neuronas GAD positivas presentan formas irregulares de tamaño mediano (56); la mayoría de estas interneuronas de la lámina VIII expresan GABA como el principal neurotransmisor inhibitorio (51).

1.3.2. Glicina

La glicina es el aminoácido no esencial más sencillo presente en el organismo. En el SNC se ha demostrado que la glicina desempeña la función de neurotransmisor inhibitorio y neuromodulador de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). La glicina está presente principalmente en la médula espinal. Tiene un rol importante en la regulación de diferentes vías motoras y sensoriales y en la alternancia de movimientos de izquierda – derecha característicos de conductas motoras específicas (57,58). Se ha demostrado inmunorreactividad a glicina en todas las láminas y en todos los niveles de la médula espinal de rata, aunque hay variación en la densidad de fibras inmunorreactivas en las diferentes regiones de la médula espinal. En el asta ventral se ha determinado que la inmunorreactividad de glicina está dada por fibras que rodean a las motoneuronas de la médula espinal. Ocasionalmente se encontraron cuerpos de células pequeñas inmunorreactivas a glicina cerca de las neuronas motoras (57,58). En la lámina VII de la médula espinal se han hallado células que coexpresan GABA y glicina denominadas

células de Renshaw. Estas realizan sinapsis inhibitorias sobre interneuronas, neuronas ventrales espinocerebelosas y otras células de Renshaw, así como sobre las α -motoneuronas (59).

1.3.3. Acetilcolina (ACh)

Las neuronas colinérgicas están involucradas en el control sensorial, autonómico y motor de la médula espinal (49). Para identificar las células que expresan ACh se utilizan tres tipos de marcadores: la colina acetiltransferasa (ChAT), enzima que sintetiza la ACh; la acetilcolinesterasa (AChE), la enzima que hidroliza al acetilcolina y el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), proteína responsable del transporte de la acetilcolina través de las vesículas sinápticas (50). En la médula espinal las neuronas colinérgicas se encuentran principalmente en la lámina IX. También se han identificado neuronas positivas para ACh en las láminas III, IV y V donde se cree que hacen parte de un sistema anti-nociceptivo endógeno (49,50). Las neuronas ChAT positivas de la lámina IX son motoneuronas. La mayoría de estas neuronas tienen forma redondeada y corresponden a las α -motoneuronas. Existe otro grupo de células más pequeñas identificadas como γ -motoneuronas dentro de esta misma lámina. Usando el anticuerpo anti-VACHT, la inmunorreactividad corresponde a neuronas grandes y pequeñas que se presume sean α -motoneuronas y γ -motoneuronas respectivamente (50). También se ha determinado que algunas neuronas inmunorreactivas para ChAT y VACHT están presentes en las láminas X y en el zona media de la lámina VII de la médula espinal (49). Existen células preganglionares del sistema autónomo simpático que expresan ACh como neurotransmisor. Estas células se extienden entre la región cervical y lumbosacra de la médula espinal desde la T1 hasta la L2 (53). En ratas, las células preganglionares simpáticas se ubican en las láminas V y VII. Sin embargo se han identificado interneuronas no colinérgicas presentes dentro de núcleos autónomos de la médula espinal. Estas interneuronas tienen características morfológicas que las distinguen como neuronas preganglionares del simpático (60).

1.4. Citoesqueleto neuronal.

El citoesqueleto ayuda a las células a mantener su forma y organización interna. También proporciona soporte mecánico que permite a las células llevar a cabo funciones esenciales como la división y el movimiento. Está conformado por tres complejos estructurales: microtúbulos (MTs), neurofilamentos (NF) y microfilamentos (MF). Cada uno tiene una composición característica, estructura y organización especializada (61,62).

1.4.1. Microtúbulos

Los microtúbulos son ensamblajes de dímeros de α y β tubulina que se unen a proteínas específicas llamadas proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs). La asociación diferencial entre estas proteínas permite una gran diversidad en la modulación funcional de los componentes del citoesqueleto en el entorno celular (62). Las MAPs se pueden dividir en tres familias distintas: MAP-1, Tau y MAP2. La familia MAP-1 tiene tres isoformas presentes en la mayoría de los vertebrados. Los miembros de la familia MAP-1 son codificados por diferentes genes; su función es la de regular y estabilizar la formación de microtúbulos. Las MAP-1 se expresan predominantemente en las neuronas y son importantes en la formación y el desarrollo de los axones y dendritas durante la diferenciación neuronal (62). La proteína Tau se encuentra localizada en el citoplasma y participa en el ciclo de asociación-disociación de los microtúbulos, confiriendo dinamismo a los mismos (63). En la familia MAP2 las isoformas se dividen en las de alto peso molecular (MAP2A y MAP2B) que se expresan exclusivamente en las neuronas maduras; su expresión se limita al cuerpo celular y las dendritas, pero no se encuentran en los axones. Las MAP2 de bajo peso molecular (MAP2C y MAP2D) están presentes en todos los compartimentos neuronales y en células gliales (62,63). Dentro de las funciones de las MAP2 se encuentran: estabilización de los microtúbulos, inhibición de la polimerización, aumento de la rigidez de los microtúbulos y modulación de la iniciación de las neuritas. Además participan en la formación de entrecruzamientos entre los microtúbulos y los neurofilamentos (63).

1.4.2. Neurofilamentos

Los filamentos intermedios se caracterizan por ser los elementos del citoesqueleto más rígidos y resistentes, forman una red periférica al núcleo y se extienden alrededor de la célula. Su misión fundamental es proporcionar resistencia mecánica a la célula, así como regular la distribución de proteínas y la transmisión de señales intracelulares. Los neurofilamentos se encuentran en el pericarion y dendritas pero más abundantes en los axones de las neuronas del sistema nerviosos central y periférico. Están formados por polímeros en tripletes proteicos de 3 subunidades de tubulina de 68, 160 y 200 Kd (Kilodalton), que son los llamados NF-L (Low), NF-M (Medium) y NF-H (High), respectivamente. Tienen un diámetro de 10 nm y la cantidad de NF es proporcional al calibre de la fibra nerviosa (64). Las tres subunidades NF se expresan en distintas etapas del desarrollo de los vertebrados, asociadas a la diferenciación neuronal. Inicialmente, NF-L se expresa al comienzo de la diferenciación neuronal y se solapa con la expresión de internexina y periferina. NF-M se expresa poco después con la aparición de la formación de neuritas, mientras que NF-H se expresa más tarde, cuando se requiere el crecimiento axonal radial para la maduración del sistema nervioso (65). La función de los NF-H es fundamentalmente estructural; participa en el crecimiento radial de los axones durante el desarrollo, el mantenimiento del calibre del axón y la transmisión de impulsos eléctricos a lo largo de los axones, es decir, en la velocidad de conducción nerviosa (64). En algunas condiciones patológicas los neurofilamentos pueden acumularse en grandes cantidades dentro de los cuerpos celulares y axones proximales de las neuronas afectadas. Ejemplos: la atrofia muscular espinal, la paraplejía espástica, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (64,65).

1.5. El marcador neuronal NeuN

La proteína nuclear neuronal (NeuN) se conoce desde 1992 (66) y ha sido utilizada como marcador neuronal en estudios neurohistológicos y neuropatológicos pues permite distinguir entre neuronas y otros componentes del tejido nervioso (67). Se ha propuesto como un sustituto de la técnica de Nissl para llevar a cabo conteos neuronales (68), aunque algunos investigadores han cuestionado su uso con ese propósito (69). Otro aspecto que se debe tener en cuenta es que esta proteína parece no estar presente en algunos tipos de neuronas, por ejemplo, en células de Purkinje, células mitrales, células de Cajal-Retzius, y células ganglionares simpáticas (66,67,70). La aparente falta de expresión de NeuN en estas células ha sido objeto de diferentes interpretaciones, no obstante, su utilidad como marcador neuronal sigue siendo reconocida (70). La reacción inmunohistoquímica se presenta principalmente en el núcleo, pero se ha demostrado inmunorreactividad en el citoplasma y en las dendritas. Además de ser un marcador de neuronas maduras, es útil para examinar etapas de desarrollo y diferenciación del CNS. La disminución de la positividad para NeuN en algunos casos se puede asociar a degeneración neuronal (71,72).

1.6. Antecedentes.

1.6.1. Estudios sobre neurotransmisores y citoesqueleto en rabia

Estudios sobre los efectos de la infección con rabia relacionados con neurotransmisores son escasos. Hay evidencia de que el virus de la rabia utiliza los receptores nicotínicos de la acetilcolina de la unión neuromuscular para su ingreso a la célula blanco (73,74,75). En un estudio en ratones se reportó disminución no estadísticamente significativa (entre el 5 y 10%) de la expresión de ChAT y AChE en el hipocampo y la corteza cerebral (76). Aunque es posible que el sistema colinérgico esté relacionado con la sintomatología clínica severa, hasta ahora no hay suficiente evidencia demostrada sobre disfunción del sistema colinérgico en rabia (44,76). También se han realizado trabajos que sugieren alteraciones

en la neurotransmisión serotoninérgica relacionadas con las manifestaciones clínico-patológicas de esta enfermedad viral (77,78)

Existe evidencia de la participación del GABA en la patogénesis de la rabia. Se ha demostrado la disminución del contenido de GABA en el cerebro de ratas infectadas con rabia (79) y en la absorción y transporte de GABA en cultivos de células embrionarias corticales (80). En la corteza cerebral motora y en la capa molecular del cerebelo de ratones inoculados con virus CVS la infección provocó la disminución en el número de neuronas positivas para GABA (81,82). En contraste se ha demostrado aumento de glutamato en la capa granular del cerebelo e inmunorreactividad diferencial (aumento o pérdida) en dos áreas de la corteza motora (82,83). Estos hallazgos sugieren que existe un desbalance entre la inhibición y la excitación neuronal durante la patogénesis de la rabia en donde las alteraciones del metabolismo GABA-glutamato pueden ser parte de las causales de disfunción neuronal (82). La evaluación de los resultados del efecto de la infección con el virus rábico sobre marcadores de neuronas gabaérgicas ha contribuido a reforzar esta hipótesis (84,85,86,87,88)

También es escaso el conocimiento del efecto de la infección con virus de la rabia sobre proteínas del citoesqueleto. Se ha reportado disminución de inmunorreactividad de MAP2 y NF-H en neuronas infectadas *in vitro* (89) y pérdida de filamentos de actina en el hipocampo de ratones (90). Desde hace algún tiempo se ha asociado la pérdida de la expresión de MAP2 con alteraciones en la morfología dendrítica (91). En contraste recientemente se ha demostrado patología dendrítica y aumento de inmunorreactividad de MAP2 en la corteza cerebral de ratones infectados con virus de la rabia (38,39,40,46,92). Este resultado está en concordancia con el hallazgo de la sobreexpresión del gen de la MAP2 en pacientes con rabia encefálica (93). Estos hallazgos sugieren que la degeneración de los procesos neuronales por la disrupción de la integridad del citoesqueleto debido a la infección con el virus de la rabia es un posible mecanismo de la disfunción neural (35).

1.6.2. Rabia y médula espinal

Generalmente la médula espinal es la primera estructura del SNC en ser infectada por el virus de la rabia. En ratones se ha demostrado que la región lumbo-sacra es inicialmente invadida después de la inoculación intramuscular del virus en las extremidades posteriores (94). El tiempo promedio entre la llegada del virus a la médula y la muerte de una persona o animal infectado permite una mayor acumulación de antígeno en esta área. Por esta razón se ha recomendado el diagnóstico de la rabia en la médula espinal para todos los especímenes que son negativos en el examen del encéfalo (95). Se reportó hemorragia de la sustancia gris de la médula espinal en un caballo con rabia. En algunas de sus neuronas se presentaron alteraciones en el citoplasma caracterizadas por la formación de un material homogéneo cristalino con una aparente deshidratación celular. Los cambios en la sustancia blanca de la médula espinal fueron leves; en ocasiones se encontró infiltración perivascular (96). En modelos animales inoculados con virus CVS de la rabia por vía intramuscular se ha observado cromatolisis, presencia de cuerpos de Negri, gangliocitos necróticos con proliferación microglial, linfocitos, macrófagos y numerosas células con características de apoptosis y necrosis. Sin embargo, estos cambios no se han observado en la médula espinal con inoculaciones intracerebrales del virus (36,42,97).

Las investigaciones en la médula espinal se han enfocado más en estudiar las alteraciones histopatológicas (36,42,97) y en el uso del virus atenuado como trazador neuronal para caracterizar tractos espinales (94,98,99), aparentemente ignorando los cambios bioquímicos a nivel celular que en conjunto pueden llevar a la disfunción del sistema nervioso. En un estudio previo se determinó que la rabia genera pérdida en la expresión de calbindina y aumento de parvoalbúmina, dos proteínas de unión a calcio que se encargan de mantener las concentraciones de calcio residual (87). Estos resultados fueron similares a estudios realizados en áreas encefálicas (84,85,86). Existe evidencia de la co-expresión de estos dos marcadores en células que expresan GABA y glicina en la médula espinal (100). Por otra parte, es posible que el virus afecte la síntesis de neurotransmisores en la médula como ya se ha reportado en algunas áreas encefálicas (81,82,83).

2. Objetivos

2.1. General.

Estudiar el tejido infectado con el virus de la rabia en la médula espinal de ratones mediante el análisis de la distribución de los antígenos virales, la inmunorreactividad de marcadores neuronales y la ultraestructura de las células infectadas.

2.2. Específicos.

- Identificar las áreas inicialmente infectadas con el virus de la rabia en la médula espinal de ratones.
- Evaluar la inmunorreactividad de NeuN, glicina, GABA, la enzima Glutamato descarboxilasa (GAD-67), la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), en la médula espinal de ratones inoculados con el virus de la rabia.
- Estudiar el efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la expresión de dos proteínas del citoesqueleto (MAP2 y neurofilamento pesado) y su relación con patología dendrítica en la médula espinal de ratones.
- Analizar la ultraestructura de la médula espinal en ratones infectados con el virus de la rabia.

3. Materiales y métodos

3.1. Manejo de animales e inóculo viral.

El material biológico utilizado correspondió a ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa ICR (Institute of Cancer Research) de 4 semanas de nacidos (\pm 28 días) con un peso promedio de 19 gramos. La selección de los animales para la conformación de los grupos se realizó al azar. Los ratones estuvieron confinados en una sala de alta seguridad del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), en las siguientes condiciones ambientales: temperatura promedio de 20°C, humedad relativa (RH) de 50, ciclos de 12 horas luz/oscuridad, comida y agua *ad libitum*. Adicionalmente durante el desarrollo de este trabajo se cumplieron con las condiciones ambientales y nutricionales, de acuerdo con normas éticas nacionales (Ley de 1989 y resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud) e internacionales exigidas para la investigación con animales de laboratorio. Se contó con el aval ético del comité de ética el INS y del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Esta investigación se realizó siguiendo el “Protocolo para el uso de animales de laboratorio” y el “Protocolo de bioseguridad para la inoculación y manejo de ratones con el virus de la rabia” (Anexo A) establecidos por el INS.

3.2. Infección viral, fijación y extracción de la médula espinal.

Para Identificar las áreas inicialmente infectadas con el virus de la rabia en la médula espinal de ratones (*Objetivo 1*) se inocularon 21 ratones por vía intramuscular en la región del musculo isquiotibial con 0,03 ml de una dilución del virus CVS (Challenge Virus Standard) equivalente a 33800 DL50 suministrado por el Laboratorio de Virología del INS conservado a 4°C. Posteriormente cada 8 horas a partir de las 24 horas hasta las 72 horas post-inoculación (Pi), grupos de tres ratones se anestesiaron con 0,2 ml de hidrato cloral (Merck) al 30% inoculado por vía intraperitoneal. Una vez los animales alcanzaron el estado de inconsciencia, se realizó la fijación de los tejidos por medio de perfusión intracardiaca, se dejó circular inicialmente tampón de fosfato salino (PBS) pH 7,3 durante 3 minutos (aproximadamente 30 ml) y luego la solución de fijado preparada con paraformaldehído (PFA) al 4% (aproximadamente 70 ml). Después de completar la perfusión con el fijador nuevamente se dejó circular PBS por 1 minuto. Luego se extrajo cuidadosamente la médula espinal y se transfirió a solución fresca de PFA al 4% para posteriormente llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico de localización de los antígenos virales, en cortes transversales de los niveles lumbar, torácico y cervical, cada 8 horas a partir de las 24 horas Pi.

Con el fin de evaluar el efecto del virus de la rabia sobre la inmunorreactividad de marcadores de neurotransmisores y la expresión de la proteína nuclear neuronal (NeuN) y de dos proteínas del citoesqueleto (*Objetivos 2 y 3*) se inocularon 10 animales por vía intramuscular en la región del musculo isquiotibial con 0,03 ml de una dilución del virus CVS (Challenge Virus Standard) equivalente a 33800 DL50 y sus respectivos controles (10 animales) inoculados con la solución diluyente, sin el virus. Los animales se mantuvieron en observación durante los días siguientes y se tomó nota de los signos clínicos hasta el momento en que se llevó a cabo el sacrificio de los mismos (estado terminal o de postración). Se eligió hacer este trabajo con animales en fase avanzada de la enfermedad pues diferentes estudios han demostrado que la infección sólo produce efectos notables en esta condición (86).

La obtención del tejido medular se realizó como se ha descrito anteriormente; sin embargo, la fijación de los tejidos (desde la perfusión) tuvo algunas diferencias según la técnica de estudio a realizar. Con PFA al 4% se fijó el material destinado a inmunohistoquímica para MAP2, NF, NeuN, VAcHT, ChAT y GAD (5 infectados y 5 controles). Una mezcla de PFA al 4% y glutaraldehído (GA) al 0,5% se requirió para la inmunohistoquímica dirigida al estudio de la inmunorreactividad de los neurotransmisores GABA y glicina (5 infectados y 5 controles). Para analizar la ultraestructura de las neuronas motoras de la médula espinal en ratones infectados con el virus de la rabia (*Objetivo 4*) se inocularon 5 animales con sus respectivos controles (5 animales) como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, se inocularon 5 animales con 0,03 ml equivalente a 100.000 LD50 de virus calle obtenido partir del cerebro de un perro infectado (virus de origen silvestre o tipo 'calle'). La fijación y extracción se realizó como se ha detallado previamente, sin embargo, la fijación se realizó con PFA al 4% y GA al 2%. Por último, con el fin evaluar el efecto del virus de la rabia en la arborización dendrítica (*Objetivo 3*) se utilizaron 5 animales infectados y 5 controles que se perfundieron con solución salina.

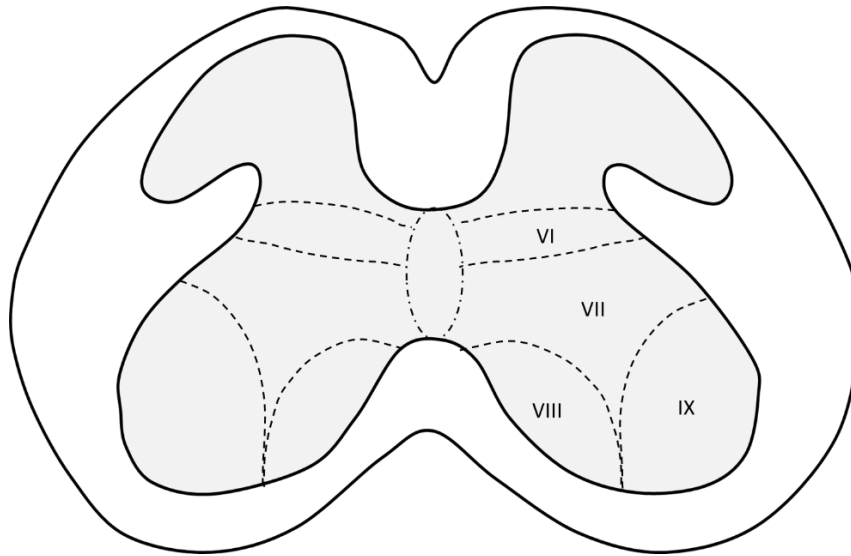
3.3. Conservación de las muestras y delimitación del área de estudio.

Una vez se realizó la fijación de la médula espinal por perfusión las muestras fueron transferidas a una solución de post fijación. Para el caso de las muestras fijadas por perfusión con PFA al 4% la solución de postfijación correspondió al mismo PFA. Las muestras perfundidas con PFA 4% y GA 0,5% se dejaron 24 horas más y las perfundidas con PFA 4% y GA 2% se mantuvieron otras 2 horas con la solución fijadora de la perfusión antes de ser transferidas a PFA 4%. Las muestras que fueron perfundidas con solución salina se transfirieron inmediatamente a la solución Cox (ver detalles más adelante, sección 3.7). Todas las muestras fueron almacenadas en una nevera a 4°C (Celsius) y fueron procesadas máximo dos semanas después de la fijación.

Para separar la región cervical de la médula espinal se realizó un corte con una cuchilla S en la base cervical donde termina el ensanchamiento cervical e inicia la región torácica de la médula espinal. El área de estudio comprendió el asta ventral a nivel cervical de la

médula espinal específicamente desde la lámina VII hasta la lámina IX según la nomenclatura establecida por Rexed (Figura 3.1). Para definir la distribución de las láminas en la región cervical se utilizó como referencia un atlas de ratón (47), y el diagrama publicado anteriormente por Monroy-Gómez & Torres Fernández (87).

Figura 3-1: Diagrama de la distribución de las láminas de Rexed en la médula espinal de ratones



Fuente Autor.

3.4. Estudio histológico (H&E).

Con el propósito de identificar la distribución neuronal y los posibles cambios histológicos básicos generados por la infección con el virus de la rabia, se colocaron secciones cervicales de la médula espinal un histoprocador y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 7 micras en un micrótopo (Leica) y se recogieron en láminas portaobjeto. Los cortes se desparafinaron en xilol (9 minutos) seguido por etanol (9 minutos). Posteriormente se colorearon con hematoxilina por 20 segundos y se pasaron por agua amoniacal por unos segundos. Luego se realizaron 3 lavados con isopropanol al 80% y coloración con eosina; a continuación se deshidrataron con pases por isopropanol, etanol y xilol. Finalmente se hicieron preparaciones permanentes utilizando Entellan® (Merck) como medio de montaje.

3.5. Estudio inmunohistoquímico.

Rodajas de médula cervical se incluyeron en agar al 4% (Merck), se montaron en un vibrátomo marca Leica (VT1000-S) y se obtuvieron series de cortes transversales de 40 micrómetros de espesor. Los cortes se recogieron en PBS en cajas de Petri pequeñas de vidrio (2,5 cm de diámetro) en donde permanecieron en condiciones ambientales de 20-22°C de temperatura y humedad del 30%. Los cortes se mantuvieron en flotación y agitación constante por medio de un agitador-vibrador marca Thermo a una velocidad de 90 rpm.

Para la detección de los antígenos se utilizó el método inmunohistoquímico indirecto, específicamente la técnica de avidina-biotina o el método PAP. Los cortes se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se dejaron en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se sometieron a los siguientes tratamientos. Incubación en NH_4Cl (Merck) para bloquear los residuos de aldehído e inhibición de la peroxidasa endógena con H_2O_2 (Merck). Luego se procedió al bloqueo de antígenos inespecíficos con una solución compuesta por suero normal de caballo (ICN), albúmina sérica bovina (Sigma) y Tritón X-100 (ICN).

Para evaluar los antígenos de interés los cortes se incubaron con los siguientes anticuerpos. Para la detección del virus de la rabia se utilizó un antisuero policlonal anti-rabia (dilución 1:2500) hecho en conejo; este anticuerpo fue elaborado hace unos años por el grupo de Morfología Celular del INS (32). Para cumplir con el segundo y tercer objetivo se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-*NeuN* monoclonal dilución 1:1000 (Chemicon Ref. MAB337) anti-*MAP2* policlonal [1:2500] (Santa Cruz Ref. sc-20171), anti-*NF-200* monoclonal [1:1000] (Sigma Ref. N4142), anti-GABA policlonal [1:1000] (Sigma Ref. A-2052.), anti-*glicina* policlonal [1:1000] (Abcam Ref. AB9442), anti-*GAD 67* monoclonal [1:1000] (Abcam Ref.ab26116), anti-*VACht* policlonal [1:1000] (Abcam Ref. ab68984), anti-*VACht* policlonal [1:1000] (Chemicon Ref. ab1579) y anti-*ChAT* policlonal [1:1000] (Abcam Ref. ab70219)

La incubación de los cortes en anticuerpo secundario biotinilado se realizó con anti-conejo [1:600] (Sigma Ref. B8895) para los anticuerpos policlonales y con anti-ratón [1:600]

(Sigma Ref. B8520) para los anticuerpos monoclonales. Luego de la incubación en anticuerpo secundario los cortes se trataron con el complejo Avidina Biotina (ABC) (Vector Ref. SK4000). Para la inmunohistoquímica del anti-*VACHT chemicon* la incubación de los cortes se realizó con anti-goat [1:400] sin paso por ABC método PAP como un método alternativo al resultado del método ABC. El revelado se realizó con el kit de diaminobencidina – níquel (DAB-Níquel Vector Ref. PK4100). Como controles negativos se procesaron cortes en los que se omitió el anticuerpo primario. Los cortes se extendieron en láminas pretratadas con gelatina (Merck) y se montaron con Entellan®. (Anexo B-C).

3.6. Estudio ultraestructural.

Fragmentos cervicales de médula espinal se montaron en un vibrátomo (Leica VT1000-S) y se obtuvieron rodajas transversales de 300 μm de espesor. Estas se procesaron para microscopía electrónica de transmisión (*Objetivo 4*) mediante el siguiente protocolo: postfijación en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas seguida de tres lavados en buffer fosfato (PB) y deshidratación en etanol en concentraciones ascendentes (50, 80, 90, 95 y 100%). Luego las muestras (rodajas) se trataron con óxido de propileno (OP). La infiltración se inició con mezclas de OP y resina Epón-Araldita (EA) (Polysciences) en proporciones secuenciales 1:1 y 1:2. A continuación las rodajas fueron embebidas en resina pura (EA) con catalizador. Las muestras se colocaron en moldes, conservando la orientación en plano transversal y luego se polimerizaron en un horno a temperatura de 70°C por un periodo de 48 horas.

En un ultramicrotomo (RMC Power Tome X) se obtuvieron cortes semifinos (500 nm) que se colorearon con azul de toluidina para observarlos en el microscopio óptico. Una vez seleccionadas las áreas de interés se obtuvieron cortes ultrafinos (60 nm) que se recogieron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo, seguido de citrato de plomo. Las observaciones ultraestructurales se realizaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-109. Se tomaron fotografías usando una cámara digital.

3.7. Método de Golgi Cox.

Para estudiar la patología dendrítica se utilizó el método de Golgi-Cox modificado (101). Rodajas de médula espinal de animales perfundidos con solución salina se sumergieron en una solución compuesta por dicromato de potasio al 5% (Merck Ref. 4952), cloruro de mercurio al 5% (Merck Ref. 4419) y cromato de potasio al 5% (Merck Ref. 4862) (solución Cox preparada con 3 meses de anticipación) en la que se dejaron las muestras durante 14 días. Luego se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% por 5 a 10 días. Se obtuvieron cortes coronales de 200 micrómetros de espesor en un vibrátomo marca Leica (VT1000-S) y se recogieron en sacarosa al 6%. A continuación los cortes se lavaron brevemente en agua destilada, se trataron con hidróxido de amonio durante 30 minutos, se lavaron nuevamente y se transfirieron a una solución de fijador fotográfico Kodak (en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente los cortes se deshidrataron en etanol y xilol y se montaron en bálsamo de Canadá (Sigma) sin diluir (39).

3.8. Análisis cualitativo y cuantitativo.

Inicialmente se realizaron observaciones cualitativas de las coloraciones histológicas con H&E y azul de toluidina para reconocer la distribución de las células y las posibles alteraciones morfológicas generadas por la infección con el virus de la rabia. Adicionalmente se realizaron observaciones de las inmunotinciones para reconocer la presencia y ubicación de las células inmunorreactivas a cada uno de los antígenos evaluados en condiciones normales y en las muestras de los animales infectados. Los tejidos procesados para microscopia electrónica se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-109 con el fin de describir los cambios morfológicos generados por la infección.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, en cada uno de los diferentes experimentos, se seleccionaron cinco casos de animales infectados con sus respectivos controles (unidades experimentales). En cada unidad experimental se seleccionaron cinco cortes (repeticiones). Para contar las células inmunorreactivas para NeuN en los cortes transversales de médula espinal se usó un micrómetro de malla Netzmiier de 1 mm²; estos

conteos se hicieron con el objetivo 10X del microscopio óptico. La inmunorreactividad de NeuN y los otros marcadores fue estudiada por densitometría óptica. Para ello se capturaron y digitalizaron las imágenes de los cortes con el programa CAPTURE PRO 6 para luego llevar a cabo el análisis de la densitometría óptica de las reacciones inmunohistoquímicas (NeuN, MAP2, NF-200, glicina, GAD 67, y VACHT) con ayuda del programa Image J.

Los datos obtenidos se trataron con el programa estadístico InfoStat. Se evaluó la normalidad de los datos con la prueba de normalidad (Shapiro-Wilks modificado) (Anexo D). Los conteos de neuronas se analizaron mediante la prueba Prueba de Wilcoxon para muestras independientes (Anexo F). Para las muestras analizadas mediante densitometría se realizó la comparación de los grupos mediante la aplicación del análisis apareado del Test Student para datos con distribución normal o el análisis apareado de Wilcoxon-Mann-Whitney (prueba no paramétrica) para datos que no presentaron distribución normal. Las pruebas apareadas permiten probar la hipótesis de igualdad de medias cuando se toman observaciones de a pares desde las dos distribuciones que se comparan (control e infectado). Es decir que se dispone de una muestra de tamaño n de pares de observaciones donde cada miembro de un par proviene de una distribución (infostat) (Anexo E).

3.9. Consideraciones ambientales.

Esta investigación se limitó a trabajo en laboratorio. Mediante el manejo de muestras de animales (ratones) de los cuales se procesó el sistema nervioso para estudio el histológico, histoquímico y ultraestructural. Para ello se utilizaron cantidades mínimas de reactivos, los cuales se manipularon y descartaron, siguiendo procedimientos de bioseguridad ya establecidos para cada uno de los laboratorios del INS. Además, la mayoría de reactivos utilizados son de categoría tóxica moderada. Por lo tanto, el estudio no provocó alteraciones en el medio ambiente.

El número de animales que se utilizó fue limitado y las personas encargadas de su manipulación tenían experiencia previa, estaban vacunadas y trabajan siguiendo normas

de bioseguridad. Además el Instituto Nacional de Salud dentro de su Sistema Integrado de Gestión y en cumplimiento de la Norma Técnica de Calidad en la gestión pública NTCGP 1000:2009, Norma Internacional ISO 9001:2008 y el Modelo Estándar de Control Interno Norma MECI 1000:2005, cuenta con el Comité de Gestión Ambiental encargado de promover y ejecutar una política ambiental que tiene como objetivo disminuir y/o mitigar los impactos negativos que se puedan generar al ambiente y la salud, a través del cumplimiento de los requisitos legales y la normatividad ambiental vigente. Por lo anterior se promueve dentro de la institución el manejo adecuado de los residuos sólidos, vertimientos y emisiones atmosféricas generadas en el cumplimiento de sus actividades de investigación.

4. Resultados

4.1. Signos clínicos de la rabia en ratones.

El 100% de los ratones inoculados con 33800 DL50 de el virus de la rabia CVS, manifestó signos clínicos de la enfermedad. El carácter positivo de la infección se confirmó mediante la localización de antígenos virales en el tejido nervioso por la técnica inmunohistoquímica (ver sección 4-2 y Figura 4-4 D). Los signos propios de la enfermedad se percibieron a partir del tercer día post-inoculación. Inicialmente los ratones presentaron un leve recogimiento y signos de parálisis de alguna de las extremidades posteriores que progresivamente se hizo más acentuado aunque conservando su capacidad de locomoción. Estos signos fueron acompañados por piloerección y pérdida de peso (Figura 4-1). El estado avanzado de la enfermedad se alcanzó entre el quinto y sexto día post-inoculación; en esta fase de la enfermedad los ratones perdieron completamente la movilidad en las extremidades posteriores, dificultando su movimiento y sufrieron una reducción drástica de peso. Al final (sexto día) los animales terminaron completamente postrados y con reducción de su temperatura corporal percibida por su superficie muy fría (Figura 4-2).

Figura 4-1: Valores del peso en gramos, durante las primeras 120 horas postinoculación, en el grupo de ratones control y en el grupo de animales inoculados con rabia

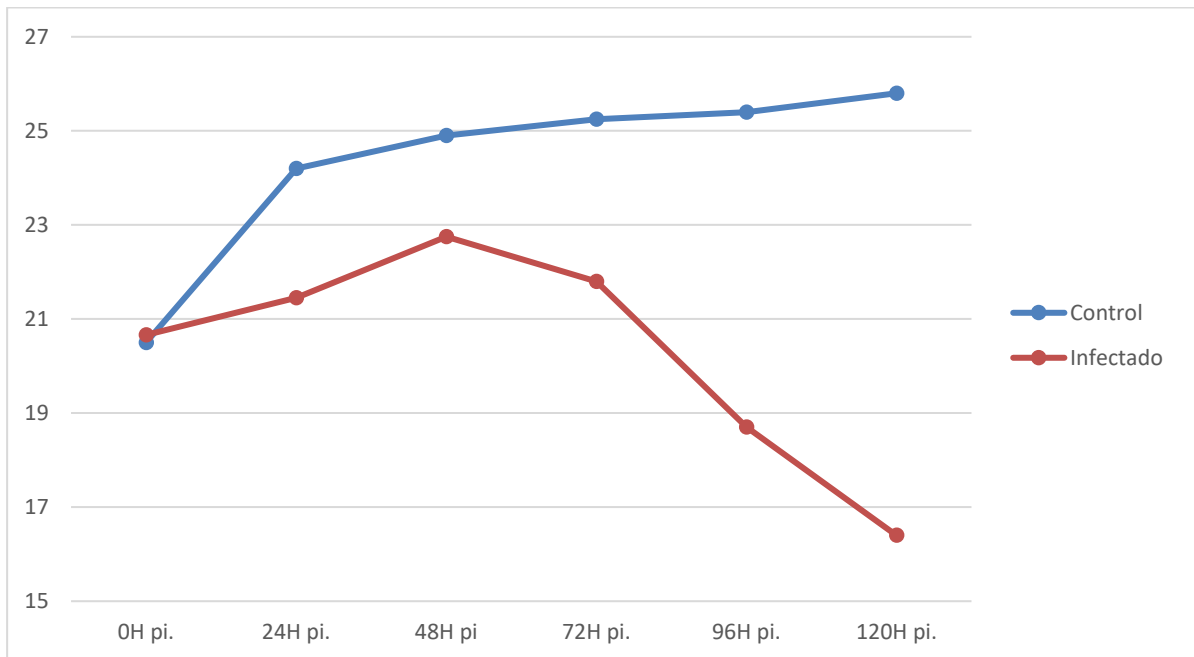
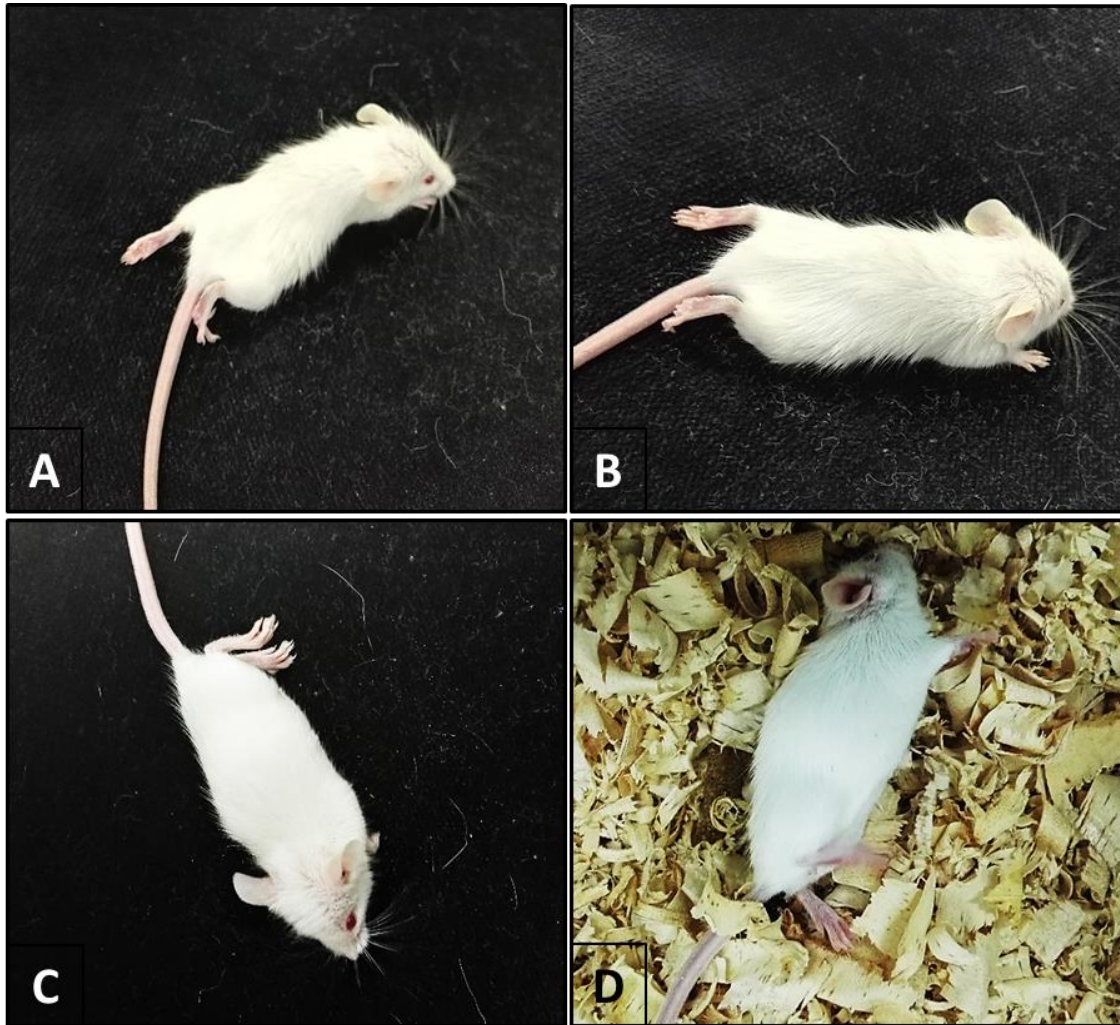


Figura 4-2: Signos clínicos en ratones inoculados con el virus de la rabia

A. Primeras manifestaciones de la infección con el virus de la rabia a los 3 días postinoculación. Se observa piloerección y flacidez en la pata izquierda. **B.** La flacidez es más evidente en las dos patas y la piloerección es más notoria. **C.** Fase terminal de la infección a los 5 días Pi. Hay parálisis en todas las extremidades. **D.** Estado de postración, a los 6 días Pi No se observa movimiento y la temperatura corporal del ratón ha descendido drásticamente.

4.2. Ingreso y diseminación del virus de la rabia en la médula espinal.

La primera evidencia de la presencia de antígenos de la rabia en la médula espinal se observó a las 24 horas Pi. Estos se manifestaron como pequeñas inclusiones, dentro del asta ventral de la médula lumbar, con ubicación ipsilateral a la extremidad posterior inoculada, a nivel de los segmentos L5-L6 (Figura 4-3 A), no se encontró evidencia de la presencia del virus en otras áreas medulares (torácica o cervical). Partículas como estas no se observaron en ninguno de los dos tipos de controles.

A las 32 horas Pi se hicieron visibles las primeras neuronas que contenían antígeno suficiente para demarcar la morfología completa de las células (pericarion y dendritas). Estas se localizaron en el asta ventral de la médula lumbar ipsilateral, entre los segmentos L5-L6, dentro del grupo de núcleos neuronales de la lámina 9, principalmente del núcleo Hm9 (Figuras 1B y C). A las 48 horas Pi el virus se había dispersado a otras neuronas dentro de la sustancia gris de los dos lados de la médula lumbar (L3-L6) (Figura 4-3 D).

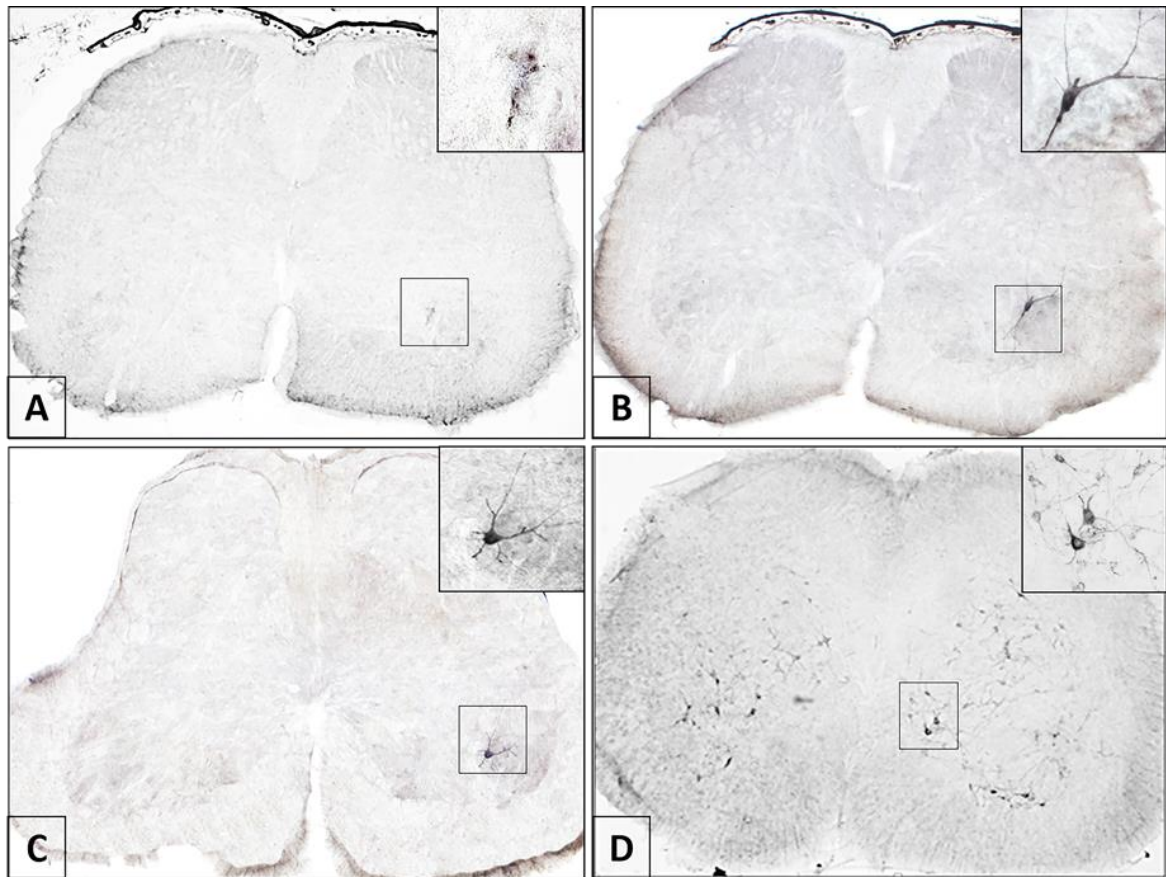
A las 40 horas Pi se observaron las primeras neuronas inmunorreactivas al virus, en la médula torácica ipsilateral al miembro inoculado, localizadas en la región medial de la sustancia gris, en un área correspondiente a la lámina 8 (núcleo 8Sp) (Figura 4-4 A), a nivel de los segmentos T11-T13. A las 48 horas Pi se reveló la presencia de las primeras neuronas inmunorreactivas en la médula cervical correspondiente a los segmentos C4-C6. Estas se ubicaron también en la zona medial ipsilateral al sitio de inoculación, dentro de la lámina 8 (Figuras 4-4 B y C).

A las 56 horas Pi se observaron neuronas inmunorreactivas dispersas en la sustancia gris de los dos lados de la médula cervical. Teniendo en cuenta que la longitud promedio de la médula espinal, extraída de cada ratón infectado, medida entre la intumescencia lumbar y la intumescencia cervical, fue de 32 mm (n=20), el virus alcanzó una velocidad de desplazamiento de 2 mm/h entre la médula lumbar y la cervical durante las 16 horas que tardó en hacer el recorrido.

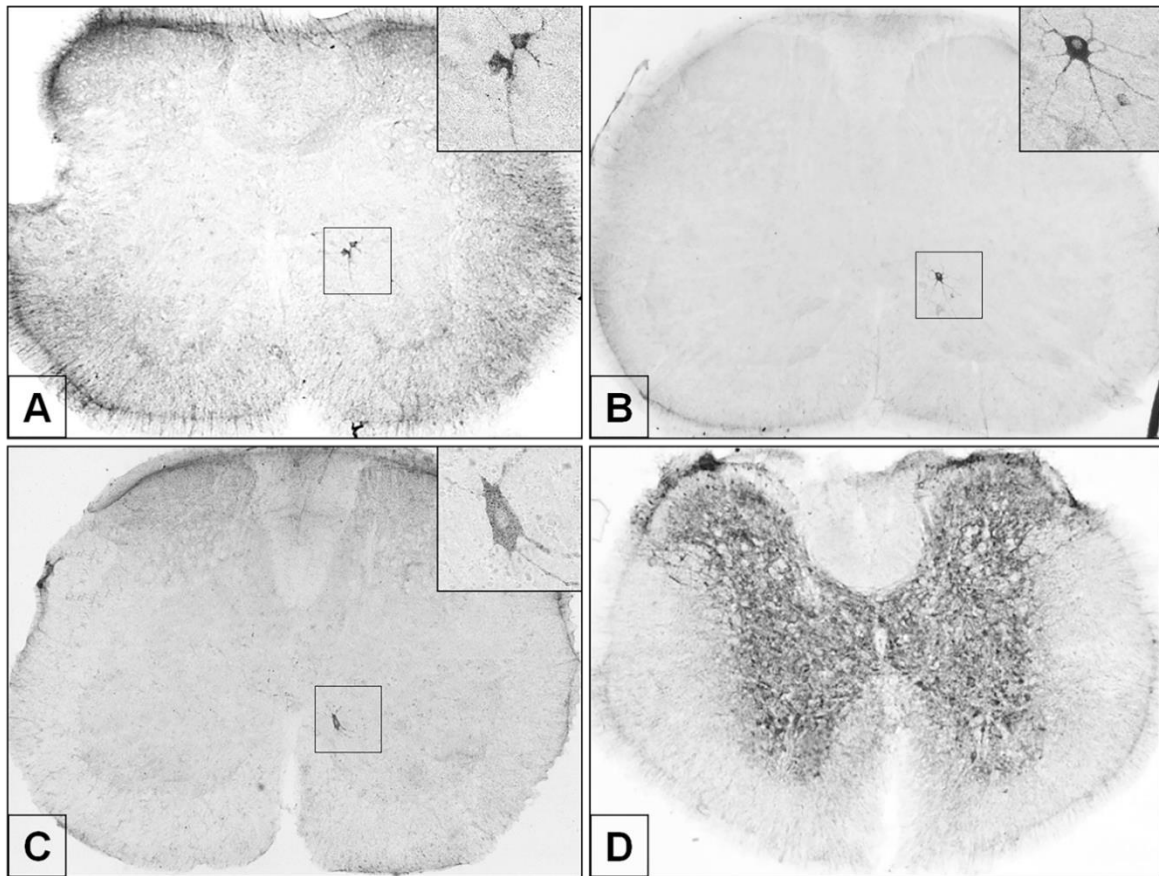
La velocidad pudo ser ligeramente mayor si se tiene en cuenta que la fijación produce retracción del tejido. Aquí es importante destacar que aun cuando el virus ya se había diseminado por toda la médula espinal, a las 56 horas Pi, los animales no manifestaban ningún signo de la enfermedad. No había señales de decaimiento o pelo erizado, ni se había afectado su locomoción, pese a que la mayoría de motoneuronas ya habían sido infectadas. Apenas a partir de las 96 horas Pi se observaron los primeros signos que consistían en parálisis parcial de las extremidades posteriores.

En la fase terminal de la enfermedad (a partir de las 120 horas Pi), la inmunorreactividad en la médula espinal exhibió una densa concentración de antígenos virales en la sustancia gris (Figura 4-4 D). En las Figuras 4-5 y 4-6 se resumen esquemáticamente los procesos de dispersión y ascenso del virus dentro de la médula espinal.

Figura 4-3: Secuencia de aparición de antígenos y neuronas inmunorreactivas al virus de la rabia en cortes transversales de médula lumbar de ratón.

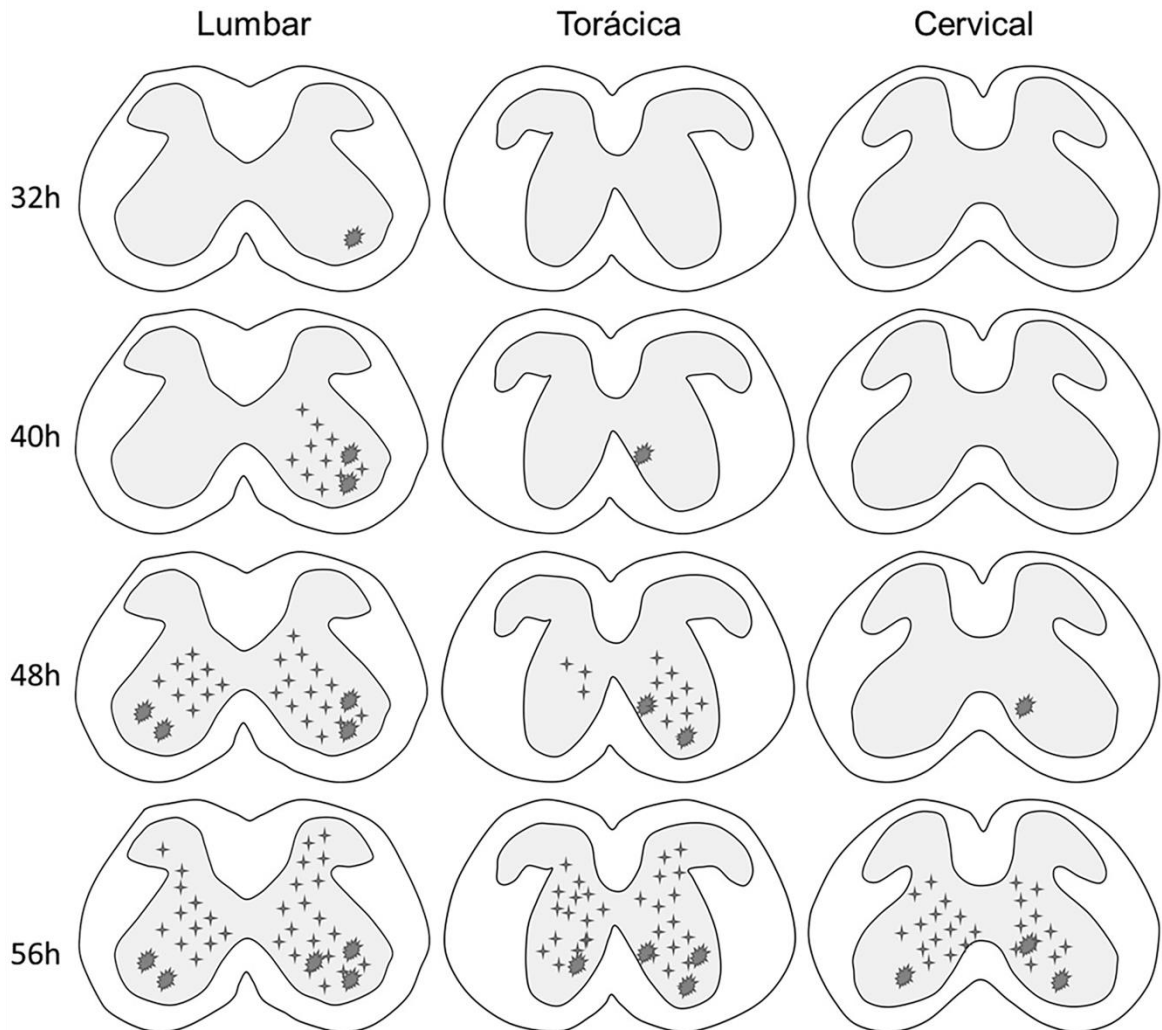


A: Antígenos virales revelados a las 24h Pi. en el asta ventral (L6). B y C: Motoneuronas del núcleo Hm9, a nivel de L6 (B) y L5 (C), a las 32h Pi El contenido de antígenos virales es tan alto que permite demarcar la morfología de las células D: A las 48h Pi el virus se ha dispersado a neuronas de los dos lados de la sustancia gris (L3). (Imágenes panorámicas en 5X y ampliaciones en 40X).

Figura 4-4: Ascenso y dispersión del virus de la rabia en los niveles torácico y cervical.

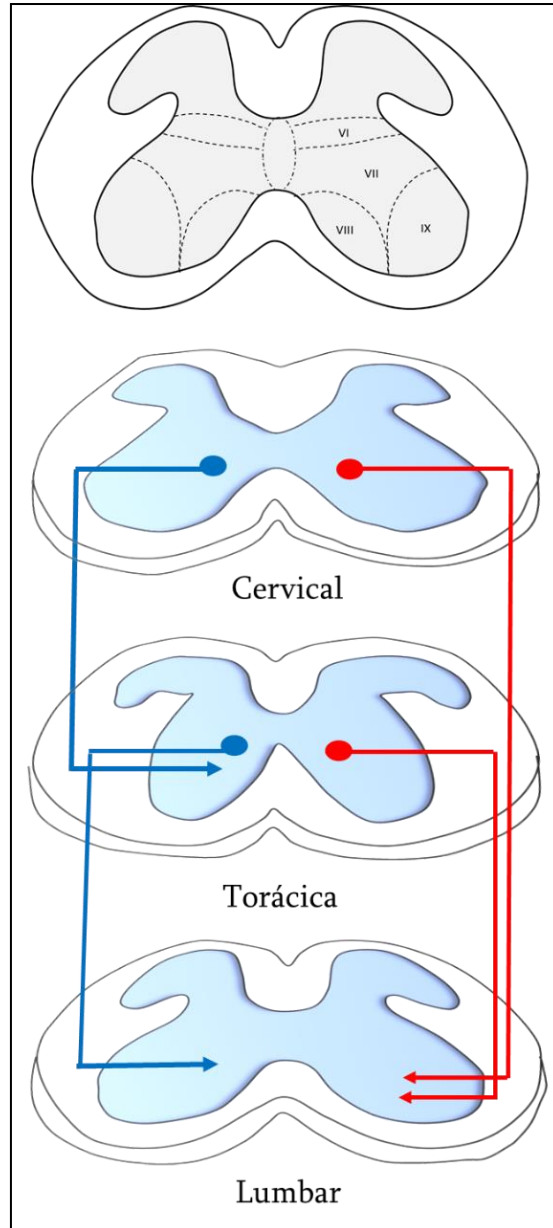
A. Neuronas inmunorreactivas al virus de la rabia localizadas en la lámina 8Sp de la médula torácica (T12) a las 40h Pi. B y C. Neuronas inmunopositivas para rabia en la lámina 8Sp de la médula cervical C6 (B) y C4 (C) a las 48h Pi. D. Inmunorreactividad a la rabia en fase avanzada de la enfermedad (120h Pi) en la médula torácica (T13) (Imágenes panorámicas en 5X y ampliaciones en 40X).

Figura 4-5: Representación gráfica de la diseminación del virus de la rabia en la médula espinal de ratón.



Representación gráfica de la diseminación del virus de la rabia en la médula espinal de ratón desde el nivel lumbar hasta el nivel cervical entre las 32 y las 56 horas postinoculación. Mientras el virus asciende a los niveles siguientes simultáneamente se dispersa en la sustancia gris de los dos lados.

Figura 4-6: Descripción de las vías de ascenso del virus de la rabia, por transporte retrógrado, desde la médula lumbar hasta la médula cervical.

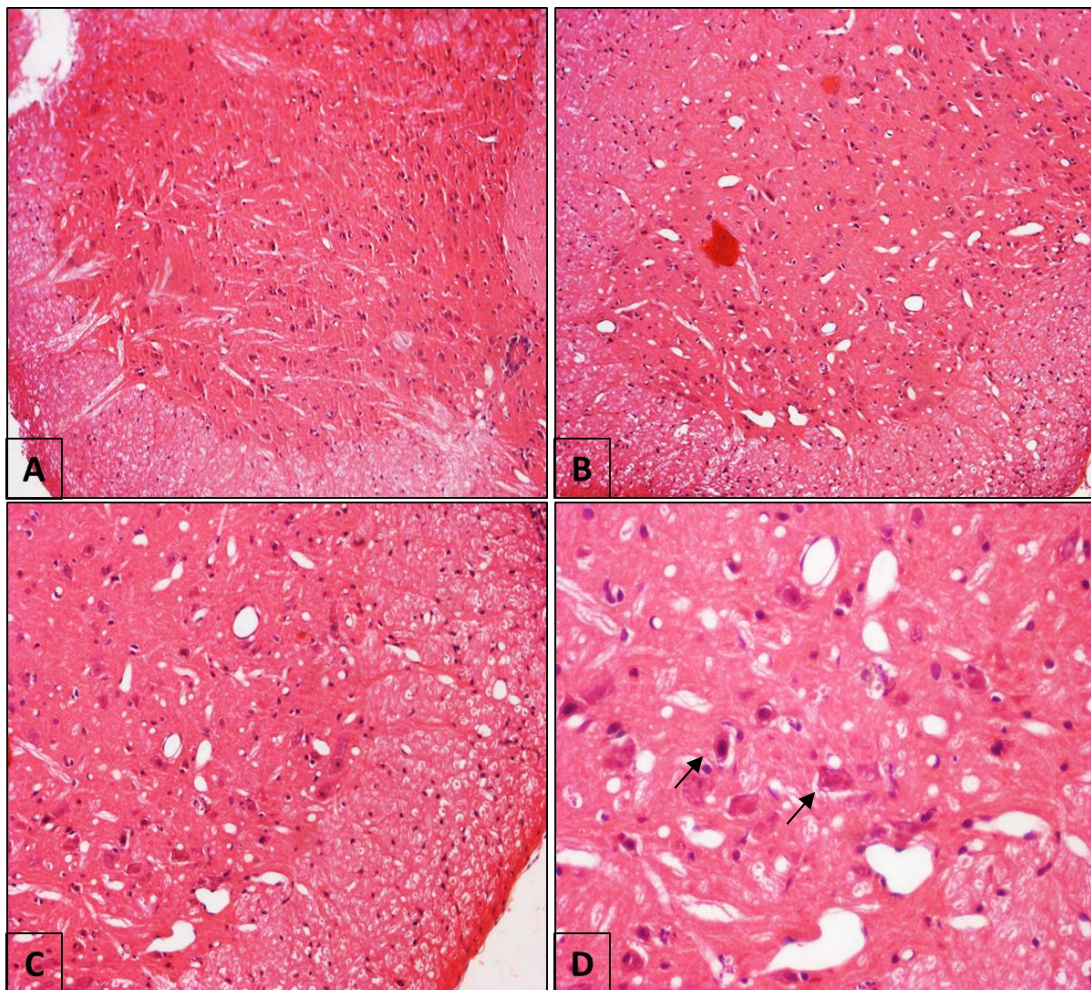


Las flechas de la derecha indican las proyecciones propioespinales desde la médula cervical y torácica hacia los núcleos motores de la médula lumbar. Las flechas de la izquierda representan las conexiones descendentes entre núcleos propioespinales.

4.3. Histología Convencional.

Se llevaron a cabo en cortes transversales de médula espinal de ratones infectados con rabia y sus controles con la técnica de hematoxilina y eosina (H & E). No se observaron cambios importantes en la estructura del tejido infectado por el virus, con excepción de la dilatación de los vasos sanguíneos (Figura 4-7). También se notó la presencia de algunas neuronas con rasgos apoptóticos (condensación de núcleo y citoplasma).

Figura 4-7: Coloración H & E en médula espinal de ratón normal e infectado con rabia

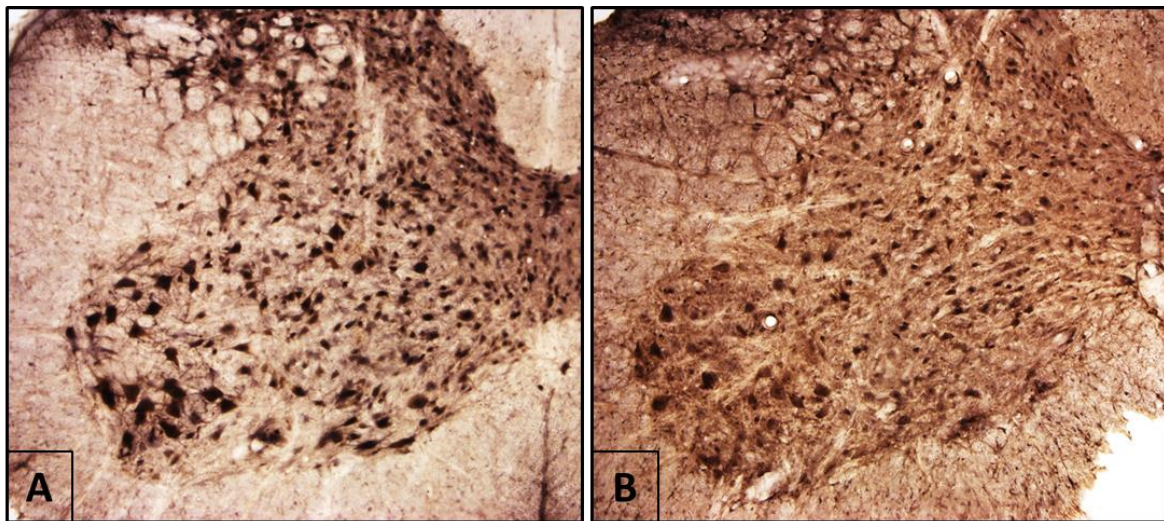


A. Ratón control. B, C y D. Ratón infectado, se evidencia mayor vasodilatación y algunas neuronas exhiben condensación de su citoplasma (flechas) (Apoptosis). Imágenes panorámicas en 10X. Ampliaciones en C- 20X y en D- 40X

4.2. Distribución de la inmunorreactividad a NeuN y efecto de la infección con el virus de la rabia.

En las muestras de los animales utilizados como controles la inmunorreactividad a NeuN se manifestó en toda la sustancia gris de la médula espinal, en neuronas de diferentes tamaños. En todas las láminas del asta ventral hubo fuerte inmunotinción de los perfiles neuronales (núcleo y pericarion). En los cortes de médula espinal de los animales infectados fue evidente la pérdida de inmunorreactividad a NeuN. Esto se manifestó principalmente por la disminución en el número de células NeuN+. La diferencia entre los controles y los infectados fue estadísticamente significativa en las láminas VII, VIII y IX así como en la sumatoria total de neuronas del asta ventral (Figura 4-8) (Tabla 4-1). Cualitativamente se observó una menor intensidad de marcación tanto en los perfiles neuronales como en el neuropilo, pero el estudio densitométrico no arrojó una diferencia estadísticamente significativa entre los controles y los infectados (Tabla 4-2).

Figura 4-8: Efecto del virus sobre la expresión del NeuN.



A. Ratón control. Obsérvese la marcación de somas (perfiles neuronales) en el asta ventral de la médula espinal. **B. Ratón infectado.** Es evidente el menor número de neuronas NeuN+. Es notable la pérdida de neuronas de mayor tamaño que corresponden a motoneuronas de la lámina IX (Aumento 10X).

Tabla 4-1: Conteo de neuronas NeuN+ en muestras control e infectadas.

Lamina	Control					Infectado					p-valor	
	Muestra	1	2	3	4	\bar{x}	1	2	3	4		\bar{x}
Lamina VII		52	37	36	43	42,0	28	28	27	22	26,2	0,0286**
Lamina VIII		61	58	50	41	52,5	26	30	21	32	27,2	0,0286**
Lamina IX		41	49	36	25	37,7	20	14	22	21	19,2	0,0286**
Total*		154	144	122	109	132,2	74	72	70	75	72,7	0,0286**

Por cada muestra se relacionan los promedios del número de células por lamina en cinco cortes.

* Promedios totales de neuronas contadas en un corte transversal de la médula espinal

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Tabla 4-2: Densitometría óptica de la inmunorreactividad a NeuN en muestras control e infectadas.

Muestra	Control	Infectado	Diferencia
1	146,79	153,97	-07,18
2	130,31	134,97	-05,15
3	143,68	170,93	-27,25
4	125,21	132,54	-07,33
\bar{x}	136,50±10,3	148,10±17,9	11,6±10,5
p-Valor	0,1141		

** Diferencias significativas. Prueba T para muestras apareadas

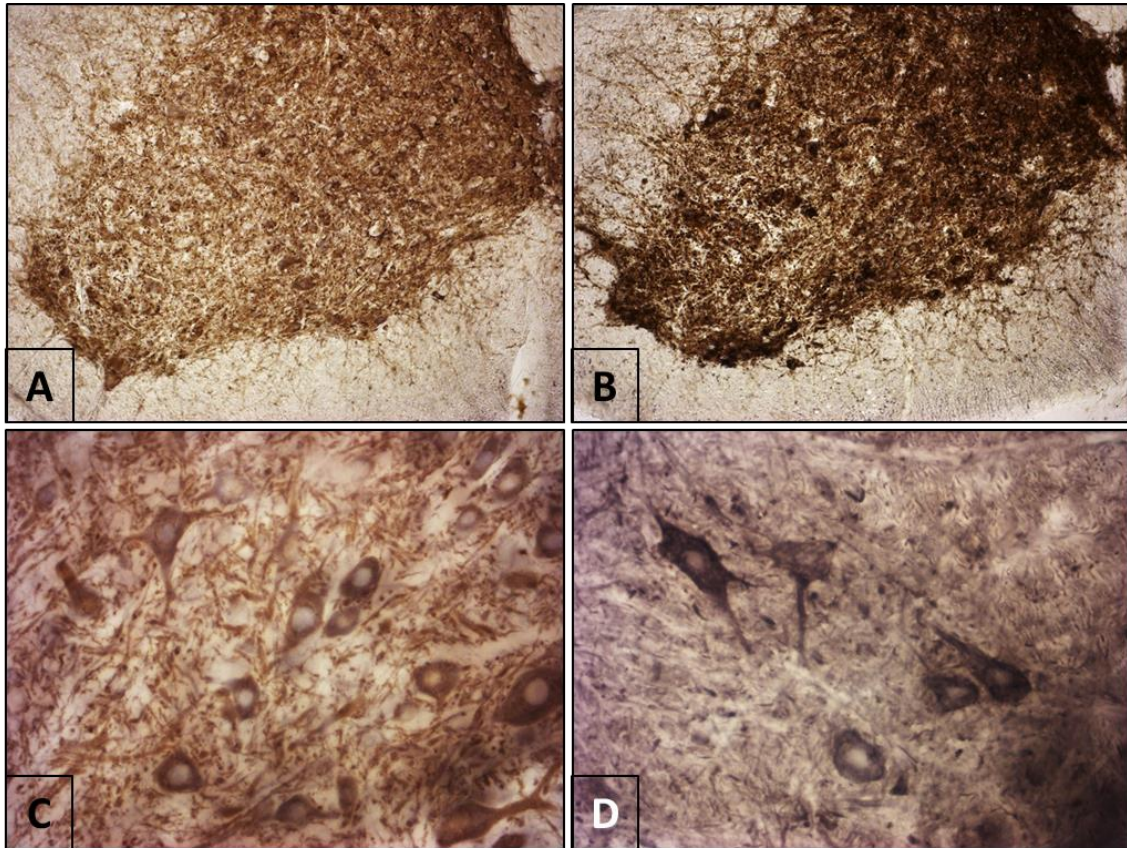
Cada dato corresponde a los valores promedio de 5 cortes por animal. los valores mayores en los infectados significa mayor cantidad de luz transmitida (menor densidad óptica) por tanto pérdida de la concentración de la proteína, la escala de luz transmitida es de 0 -255 (0 = Negro y 255 = blanco)

4.3. Distribución de la inmunorreactividad a MAP2 y NF-H y efecto de la infección con el virus de la rabia.

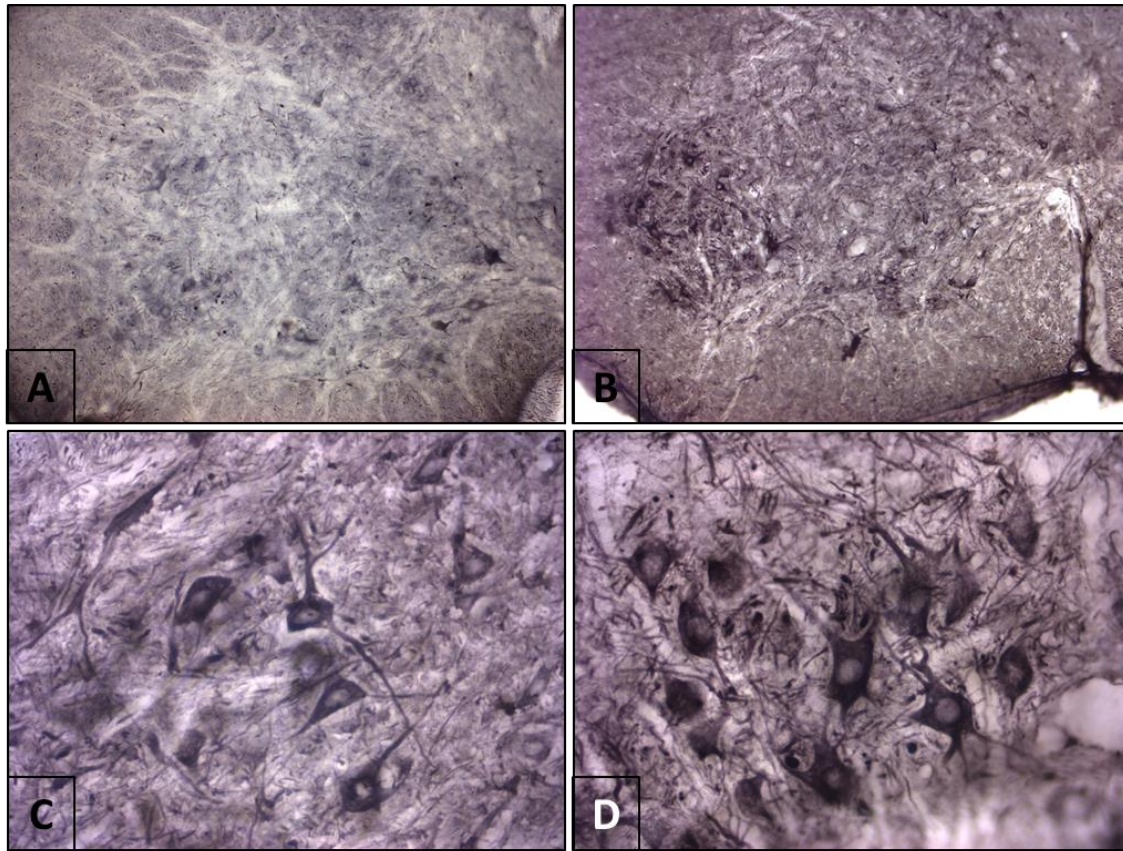
En las muestras de los animales utilizados como controles la inmunorreactividad a MAP2 se distribuyó por toda la sustancia gris de la médula espinal, en neuronas de diferentes tamaños. La marcación permitió describir en detalle la morfología de los cuerpos celulares y algunos de los procesos. Las neuronas inmunorreactivas comprendieron interneuronas y motoneuronas. La inmunotinción se observó en el pericarion pero no dentro de los núcleos de las neuronas (Figura 4-9 A y C). La inmunorreactividad a NF-H en los controles exhibió un patrón similar al descrito para MAP2 aunque la marcación fue menos intensa (Figura 4-11 A y C).

La infección con el virus de la rabia generó un aumento de la inmunorreactividad tanto de MAP2 (Figura 4-9 B y D) como de NF-200 (Figura 4-11 B y D) haciendo más intensa la marcación de somas y procesos neuronales tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca. El aumento de inmunotinción para MAP2 y NF-H fue más evidente en las neuronas de la lámina IX. La densitometría óptica de la comparación de las muestras control con las infectadas, arrojó un aumento estadísticamente significativo de la inmunorreactividad de MAP2 ($p=0,0135$) y NF-H ($p=0,0331$) en las muestras infectadas (Tabla 4.3).

Figura 4-9: Inmunorreactividad de MAP2 en la médula espinal de ratones.



A y C. Ratón control. **A.** Es notable la inmunorreactividad de los somas y el neuropilo en todas las láminas del asta ventral. **C.** En mayor aumento es evidente la marcación del citoplasma de las neuronas, pero no de los núcleos. **B y D. Ratón infectado.** La infección con el virus de la rabia generó aumento de la inmunorreactividad a MAP2 en las neuronas y el neuropilo de la médula espinal. (Imágenes panorámicas A y B en 10X. Ampliaciones C y D en 40X).

Figura 4-10: Inmunorreactividad de NF-H en la médula espinal de ratones.

A y C. Ratón control. **A.** La imagen panorámica revela marcación difusa en la sustancia gris. **B.** En mayor aumento es notable la inmunotinción del pericarion (no del núcleo) y algunos de los procesos neuronales. **B y D. Ratón infectado.** La infección con el virus de la rabia generó aumento de la inmunorreactividad a NF-H en las neuronas y el neuropilo de la médula espinal. Nótese mayor cantidad de procesos en el infectado (D) en comparación con el control (C). (Imágenes panorámicas A y B en 10X. Ampliaciones C y D en 40X).

Tabla 4-3: Densitometría óptica de la inmunorreactividad a MAP2 y NF-H en muestras control e infectadas.

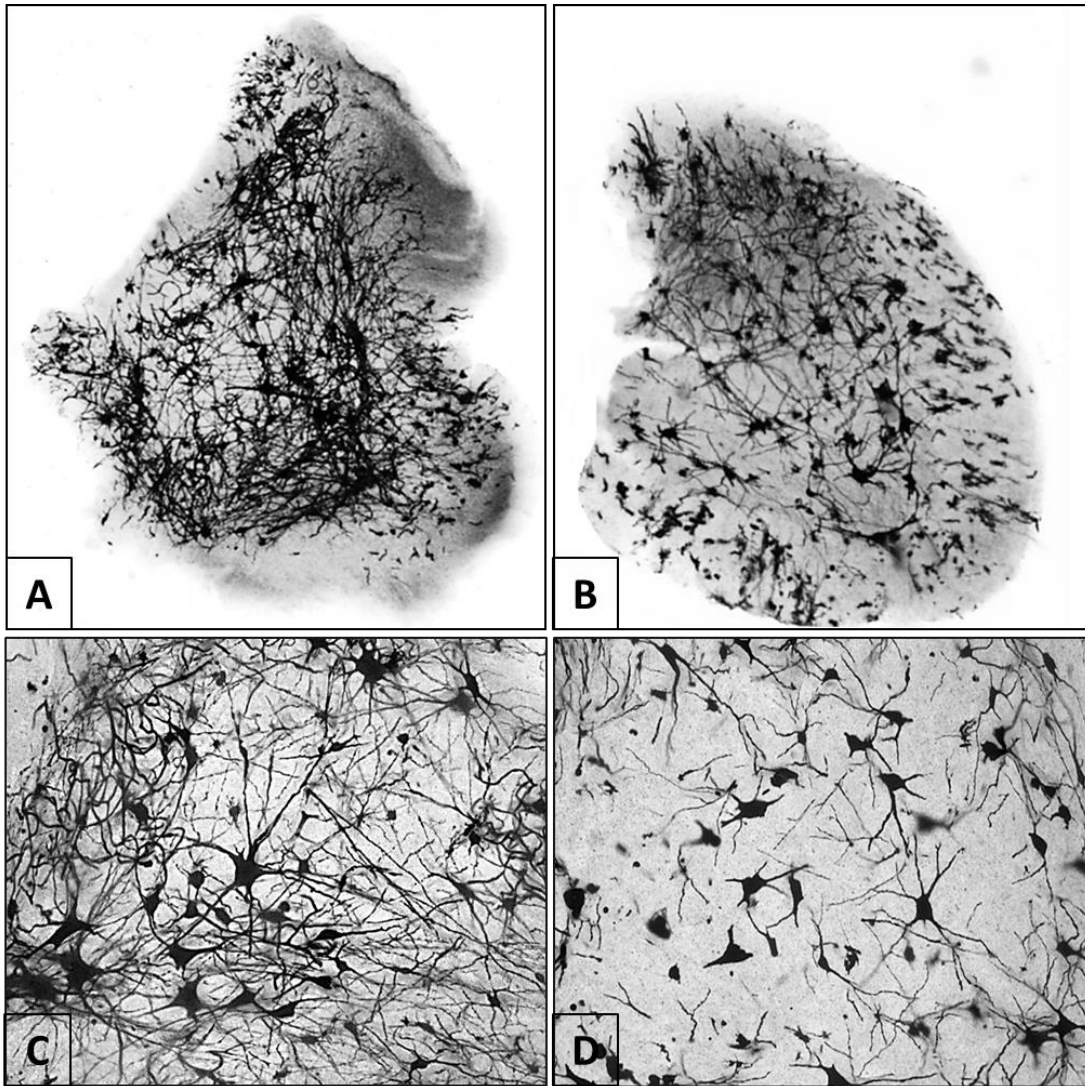
Muestra	MAP2			NF-H		
	Control	Infectado	Diferencia	Control	Infectado	Diferencia
1	79,87	58,57	21,30	119,11	89,82	29,18
2	100,65	74,39	26,26	122,00	104,37	15,63
3	84,50	83,04	1,46	86,46	82,11	4,35
4	81,33	60,72	20,61	100,61	93,75	6,86
5	99,39	78,52	20,87	80,09	47,86	32,23
□	89,15±10,0	71,05±10,8	18,10±9,5	101,65±18,8	83,58±21,5	18,07±12
p-Valor	0,0135**			0,0331**		

** Diferencia estadísticamente significativa. Prueba T para muestras apareadas

Cada dato corresponde a los valores promedio de 5 cortes, los valores menores en los infectados significa menor cantidad de luz transmitida (mayor densidad óptica) por tanto aumento de la concentración de la proteína, la escala de luz transmitida es de 0 -250 (0 = Negro y 255 = blanco)

4.4. Patología dendrítica en neuronas de la médula espinal de ratones infectados con rabia.

La técnica de Golgi permitió describir la morfología de neuronas halladas dentro de la sustancia gris. Esto incluyó el soma o cuerpo neuronal y gran parte de las dendritas entrelazadas formando una red. Las motoneuronas se destacaron por su mayor tamaño y el aspecto estrellado que le confieren las dendritas que se desprenden de su soma isodiamétrico. El diámetro promedio de los somas neuronales fue similar tanto en los controles como en los infectados (n = 25 control; X = 23,81 μ m; rango Min. 10,5 - Max. 39,2 μ m; infectado X = 21,69 μ m; rango Min. 11 - Max. 35,2 μ m). Sin embargo, fueron evidentes algunas alteraciones generadas por la infección en la morfología del patrón dendrítico, en particular, menor número de ramificaciones y menor longitud de las dendritas. Pero lo más destacado fue la disminución notable de la red de dendritas en las muestras de animales inoculados con el virus de la rabia (Figura 4-11).

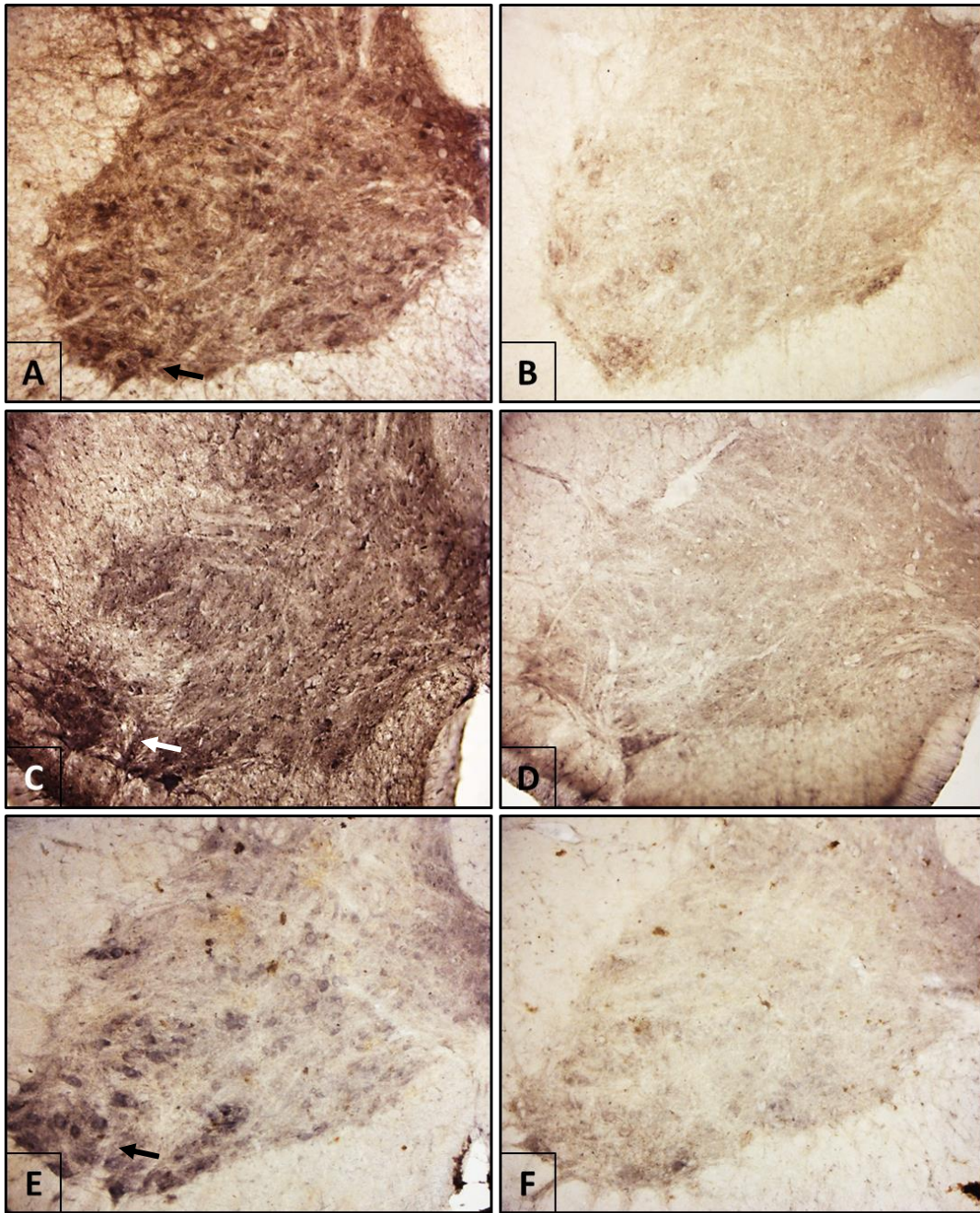
Figura 4-11: Técnica de Golgi Cox en muestras control e infectas.

A y C. Ratón control. Se observan los somas neuronales y una densa red dendrítica en el asta ventral de la médula espinal. En C se destaca una motoneurona en el centro de la imagen. **B y D. Ratón infectado.** La infección con el virus de la rabia generó una disminución notable en el número y la longitud de las dendritas de cada neurona. Esto se reflejó en una menor densidad de la red dendrítica (Imágenes panorámicas A y B en 5X. Ampliaciones C y D en 40X).

4.5. Efecto de la infección rábica sobre marcadores de neuronas colinérgicas, gabaérgicas y glicinérgicas.

Se estudió la inmunorreactividad para los diferentes marcadores que distinguen a las neuronas colinérgicas, es decir, que sintetizan y liberan acetilcolina (VACHT y ChAT), gabaérgicas (GABA y GAD) y glicinérgicas (glicina). La inmunotinción con todos estos marcadores se manifestó tanto en los perfiles neuronales como en el neuropilo circundante dentro de la sustancia gris de la médula espinal. Las neuronas positivas para marcadores colinérgicos (VACHT y ChAT) se distribuyeron principalmente en la lámina IX y en menor proporción en la lámina VIII. La inmunotinción fue más intensa para VACHT que para ChAT (Figura 4-12 A, C y E). La inmunorreactividad para GABA, glicina y GAD fue bastante intensa en el neuropilo de tal manera que enmascaró a las neuronas que fueron también positivas para estos marcadores (Figura 4-13 A, C y D). Las observaciones de los cortes se evidencia que la infección con el virus de la rabia generó disminución en la expresión de los dos marcadores colinérgicos VACHT y ChAT (Figura 4-12 B, D y F). Por el contrario, la infección aparentemente no afectó la inmunorreactividad de GABA, glicina y GAD (Figura 4-13 B, D y F). Con el análisis densitométrico de la inmunotinción para VACHT y ChAT se demostró disminución estadísticamente significativa de la inmunorreactividad de estos marcadores por efecto de la infección con el virus de la rabia, VACHT ($p = 0,0216$) y ChAT ($p = 0,0235$) (Tabla 4-4), mientras que no se hallaron cambios estadísticamente significativos en la inmunorreactividad de glicina ($p = 0,5664$), GABA ($p = 0,6207$), y (GAD) ($p = 0,6259$) en respuesta a la infección (Tabla 4-4).

Figura 4-12: Efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la expresión de marcadores de neuronas colinérgicas.



A, C y E. Ratón control. Inmunorreactividad para VACHT por el método ABC (A), y por el método PAP (C). Tanto en A como en C el marcador se expresa en toda el asta ventral pero con mayor intensidad en las neuronas de la lámina IX (flechas). En la imagen E se exhibe la inmunorreactividad para ChAT (método ABC) en donde la marcación es más evidente en neuronas de la lámina IX (flechas). **B, D y F. Ratón infectado.** Es notable la pérdida de inmunorreactividad para VACHT en

B (método ABC) y en D (método PAP). También es evidente la pérdida de inmunorreactividad para ChAT en F (método ABC). (Todas las imágenes en 10X).

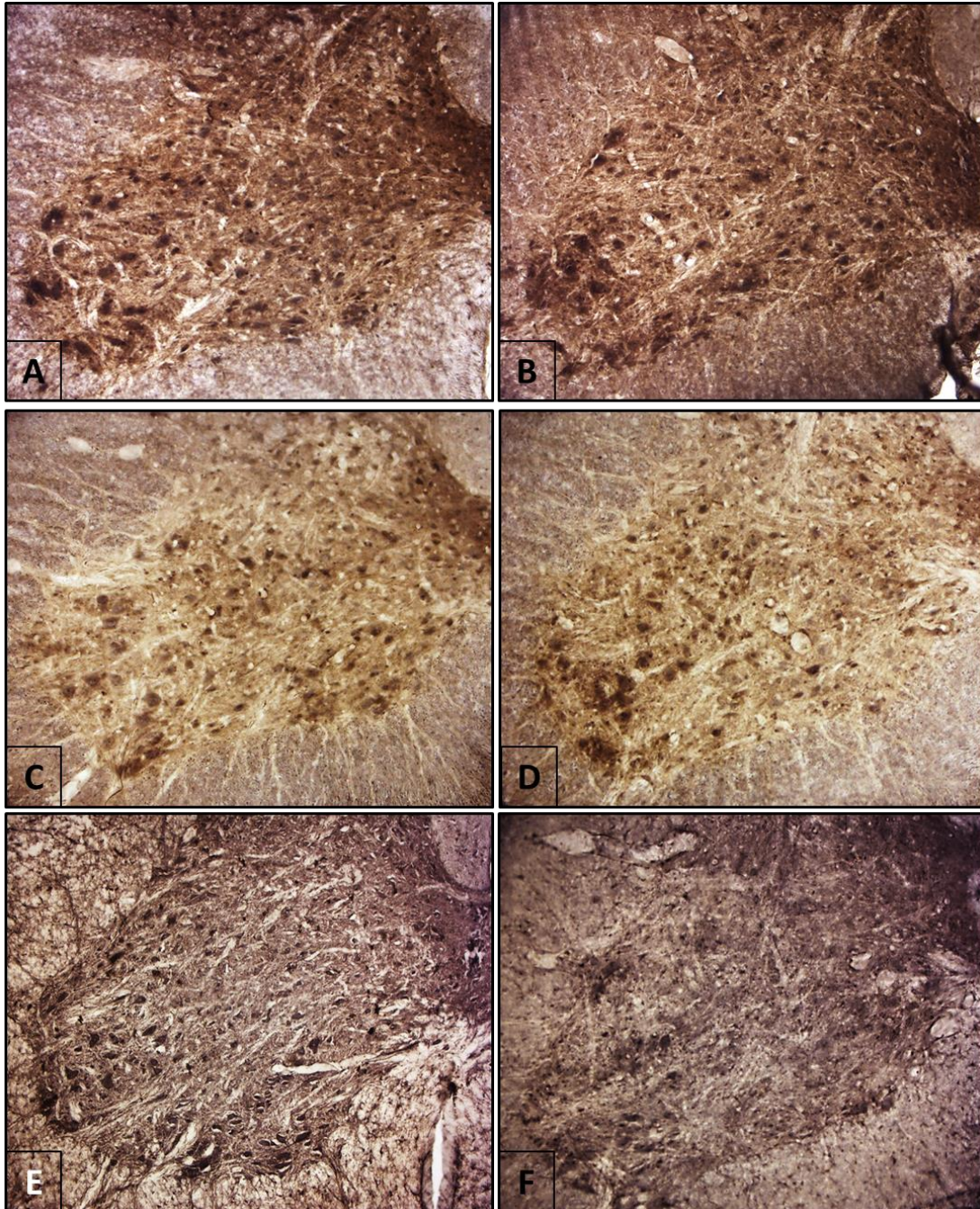
Tabla 4-4: Datos de densitometría óptica de la inmunorreactividad para marcadores de neuronas colinérgicas.

Muestra	VChT			ChAT		
	Control	Infectado	Diferencia	Control	Infectado	Diferencia
1	79,23	100,15	-20,96	128,38	144,93	-16,55
2	94,72	168,82	-74,10	127,66	163,52	-35,86
3	69,30	90,53	-21,23	91,84	149,00	-57,16
4	138,45	170,10	-31,65	87,30	120,40	-33,1
5	90,43	127,40	-36,97			
□	95,43±26,4	132,40±37,2	-35,9±21	108,8±22	144,4±17	-35,67
p-Valor	0,0216**			0,0235**		

** Diferencia estadísticamente significativa. Prueba T para muestras apareadas

Cada dato corresponde a los valores promedio de 5 cortes, los valores menores en los infectados significa menor cantidad de luz transmitida (mayor densidad óptica) por tanto aumento de la concentración de la proteína. Los valores mayores en los infectados significa mayor cantidad de luz transmitida (menor densidad óptica) por tanto pérdida de la concentración de la proteína, la escala de luz transmitida es de 0 -250 (0 = Negro y 255 = blanco)

Figura 4-13: Efecto de la infección con virus de la rabia sobre la inmunorreactividad de GABA, glicina y GAD en el asta ventral.



A, C y E. Ratón control. Inmunorreactividad para GABA (A), glicina (C) y GAD (E). Obsérvese intensa marcación en los somas neuronales y el neuropilo circundante. **B, D y F. Ratón infectado.**

Inmunorreactividad para GABA (B), glicina (D) y GAD (F). La infección con el virus de la rabia no generó ningún efecto aparente sobre la inmunorreactividad de los tres marcadores en el asta ventral de la médula espinal. (Todas las imágenes tomadas en 10X).

Tabla 4-5: Densitometría óptica de la inmunorreactividad para marcadores de neuronas Gabaérgicas y glicinérgicas

Muestra	GABA			GLICINA		
	Control	Infectado	Diferencia	Control	Infectado	Diferencia
1	94,84	107,01	-12,17	98,48	163,15	-64,67
2	93,79	88,64	05,15	86,50	153,26	-66,76
3	109,85	117,95	-08,10	121,57	100,59	20,98
4	146,79	104,29	42,47	102,40	84,82	17,58
5				117,15	91,20	25,96
□	111,32±24,7	104,47±12,1	6,83±24,9	105,22±14	118,58±36	-13,36±47
p-Valor	0,6207			0,5664		
Muestra	GAD					
	Control	Infectado	Diferencia			
1	100,71	83,29	17,42			
2	99,15	109,56	-10,41			
3	77,02	75,30	1,72			
4	90,10	120,82	-30,72			
5						
□	91,75±10	97,24±21	-5,50±20.			
p-Valor	0,6259					

** Diferencia estadísticamente significativa. Prueba T para muestras apareadas

Cada dato corresponde a los valores promedio de 5 cortes, los valores menores en los infectados significa menor cantidad de luz transmitida (mayor densidad óptica) por tanto aumento de la concentración de la proteína. Los valores mayores en los infectados significa mayor cantidad de luz transmitida (menor densidad óptica) por tanto pérdida de la concentración de la proteína, la escala de luz transmitida es de 0 -250 (0 = Negro y 255 = blanco)

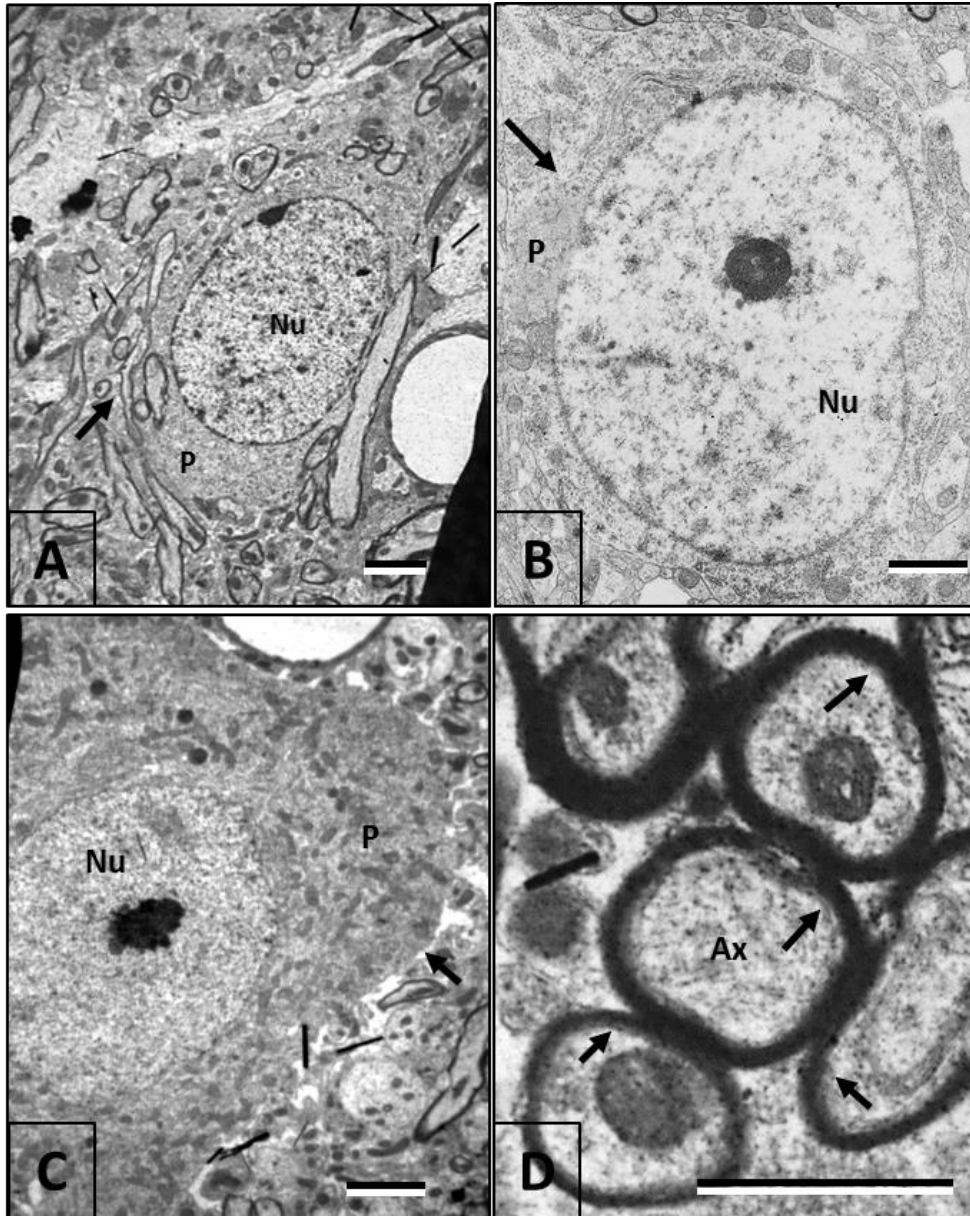
4.6. Ultraestructura.

En el microscopio electrónico se observaron diferencias en la ultraestructura de la médula espinal al comparar las muestras de ratones controles con aquellas de los animales infectados con virus 'fijo' y con virus 'calle'. En los controles (Figura 4-14) las imágenes ultraestructurales mostraron la citomorfología característica de las neuronas y los axones mielínicos: núcleos vesiculares, es decir, sin cromatina condensada; un nucléolo central prominente y un citoplasma pálido y homogéneo; membrana celular muy fina, que hace difícil la distinción entre el citoplasma neuronal (pericarion) y el neuropilo circundante. Los axones estaban rodeados de una banda de mielina oscura (electrodensa) y homogénea.

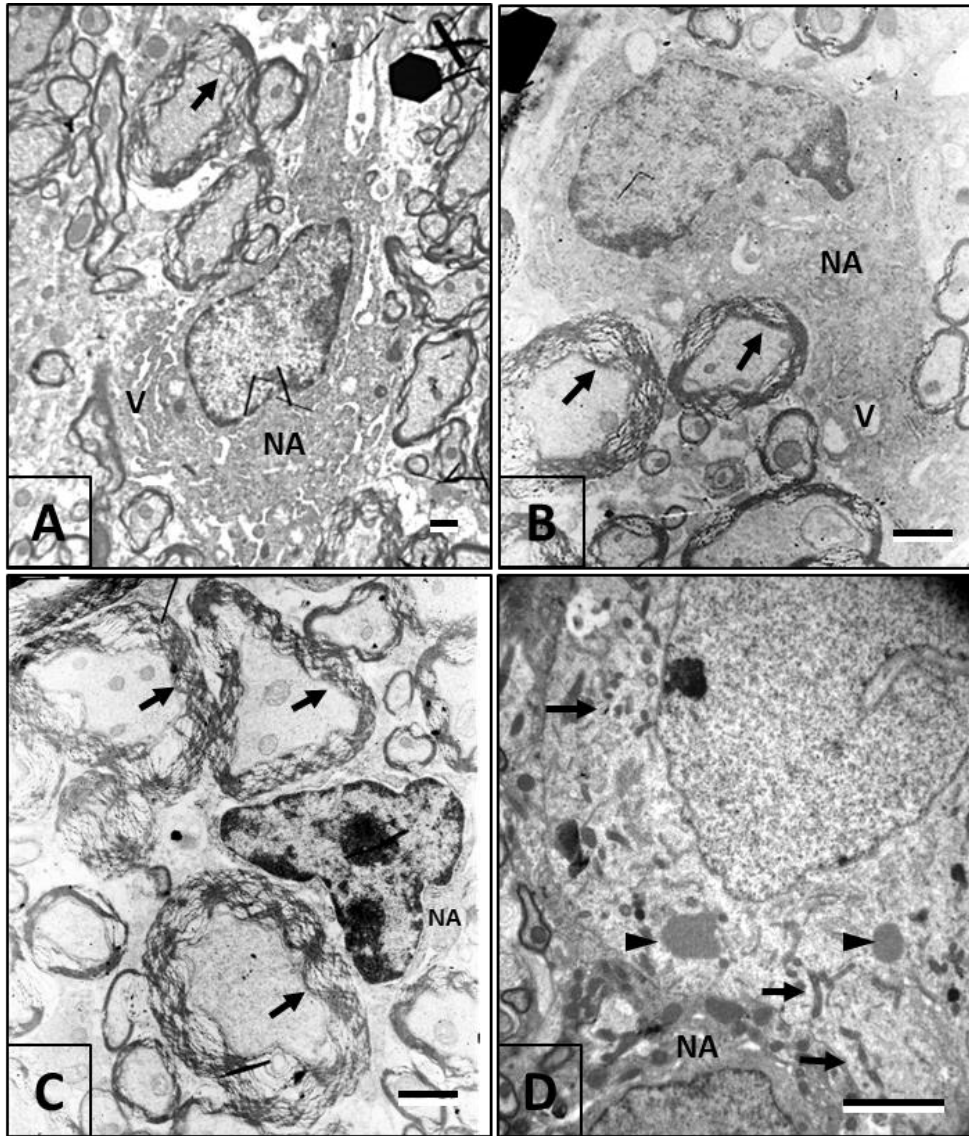
En las muestras de los animales inoculados con el virus fijo (CVS) de la rabia (Figuras 4-15 y 4-16) los principales hallazgos ultraestructurales fueron apoptosis neuronal y degradación mielínica. La apoptosis se reconoció por el carácter picnótico del núcleo (tamaño reducido y con cromatina condensada), pericarion condensado, de una tonalidad más oscura y con vacuolización. Además se encontraron células con formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación nuclear. La infección con virus 'fijo' también generó degradación de las bandas de mielina las cuales se observaron como hilos paralelos dispersos alrededor de los axones. Algunos de estos hallazgos también se observaron en los cortes semifinos coloreados con azul de toluidina (Figura 4-16).

En las muestras de los animales inoculados con virus 'calle' (Figura 4-17) no se observó ninguna alteración de importancia en la estructura fina de las neuronas, con excepción de la presencia de cuerpos de Negri. Por su parte la mielina exhibió degradación parcial en algunos axones pero no tan acentuada como la que se evidenció en el tejido infectado con virus CVS. Tanto en neuronas infectadas con virus 'fijo' como en las infectadas con virus 'calle' fue posible encontrar algunas partículas virales.

Figura 4-14: Imágenes de la ultraestructura de la médula espinal en ratones control.

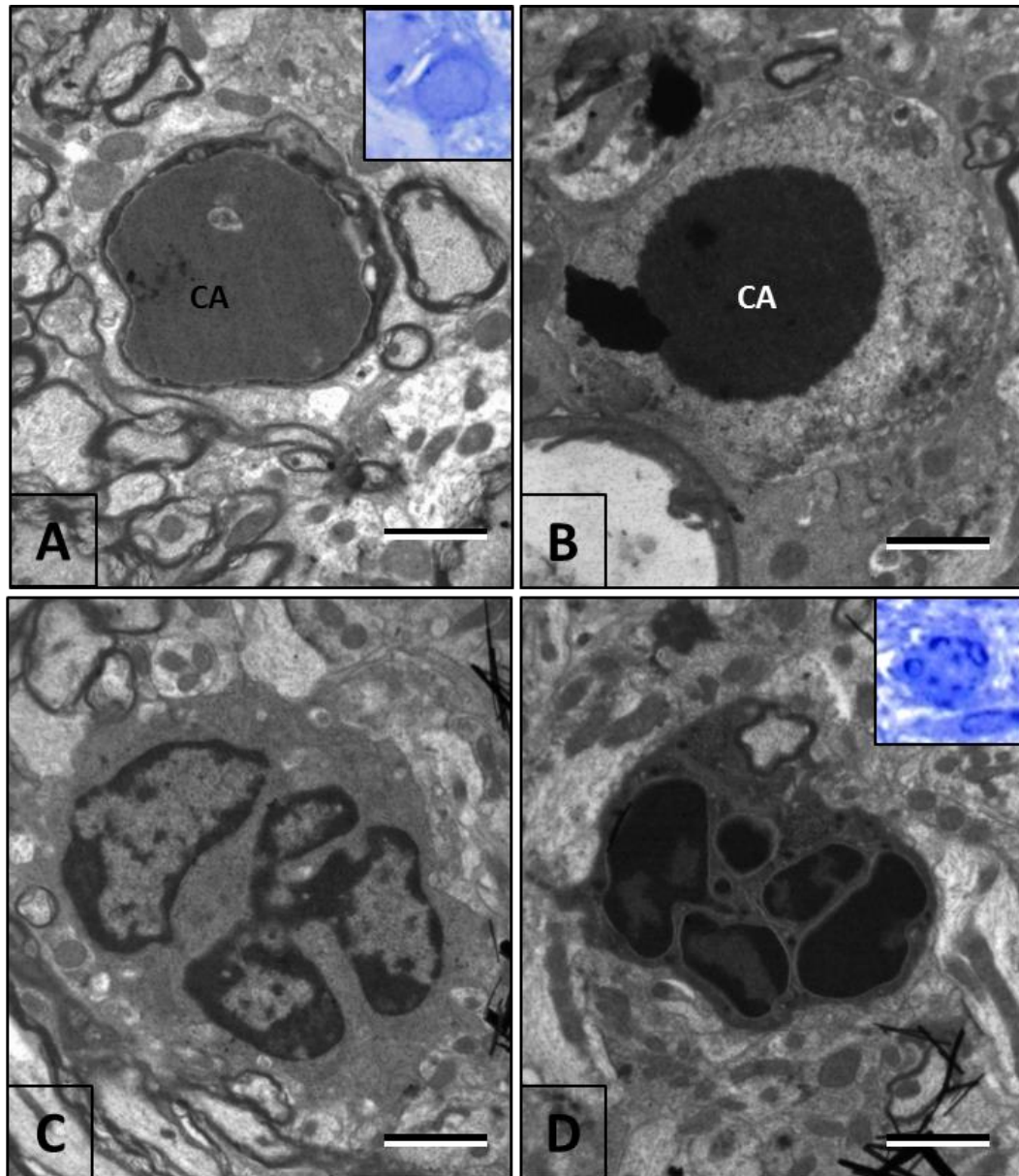


A-C. Neuronas del asta ventral de la médula espinal donde se observa un gran núcleo (Nu) vesicular (escasa presencia de cromatina) y un nucléolo central prominente. El pericarion (P) (equivalente al citoplasma) es pálido y homogéneo y apenas se distingue la membrana celular (flechas). **D.** Axones (Ax) en corte transversal rodeados por una banda densa y homogénea de mielina (flecha). Se aprecian algunas mitocondrias dentro del axoplasma. Barras = 1 μm .

Figura 4-15: Ultraestructura de la médula espinal en ratones infectados con virus CVS.

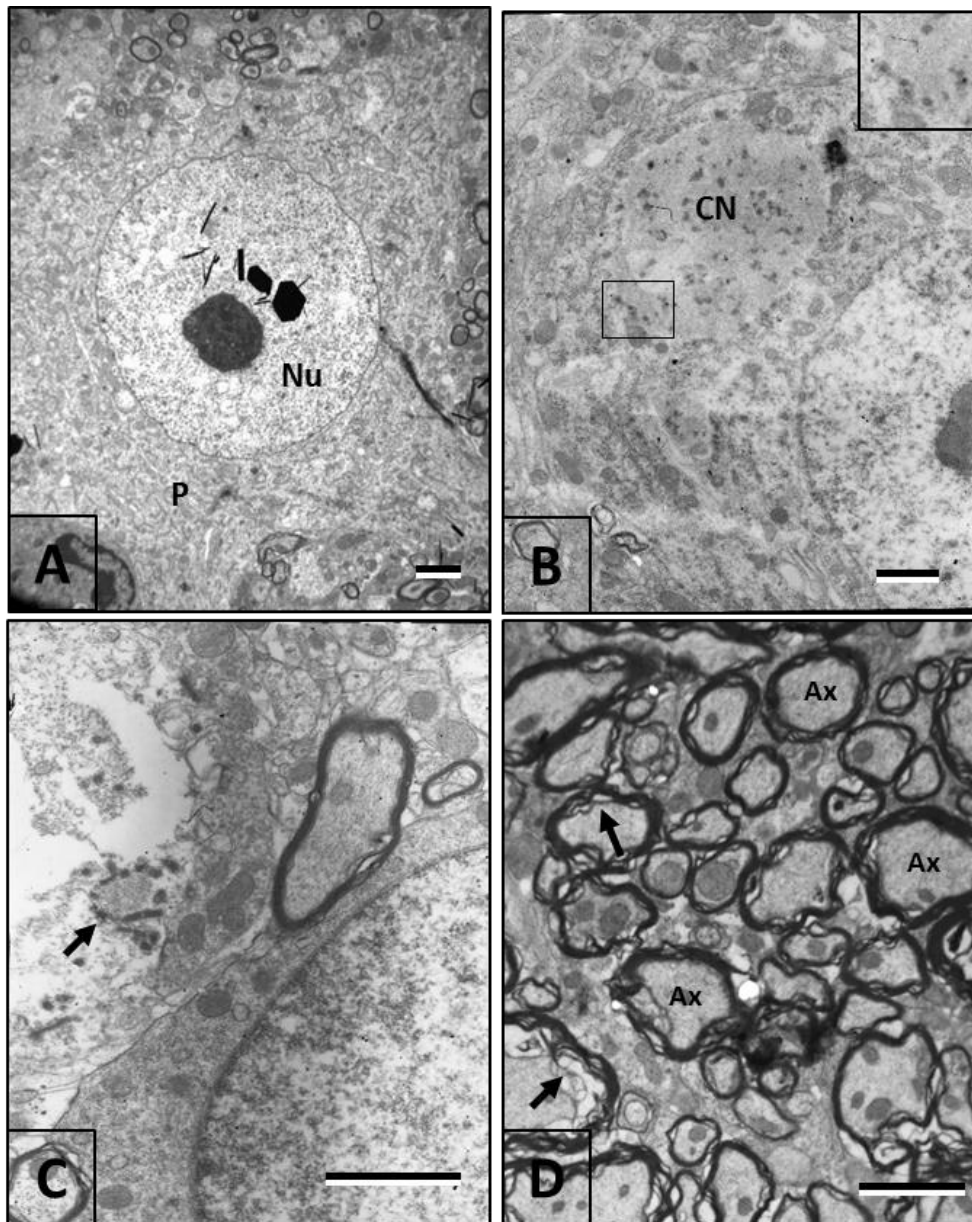
A-D. Imágenes ultraestructurales de la médula espinal de ratones inoculados con virus fijo de la rabia que exhiben diferentes rasgos neurodegenerativos. Neuronas apoptóticas (NA) que se distinguen por sus núcleos picnóticos y pericarion condensado con formación de vacuolas (V). En las figuras A, B y C también son evidentes cortes transversales de axones (Ax) que muestran degradación de la mielina. En la imagen D se aprecia una neurona sin rasgos apoptóticos donde se observan varias partículas virales (flechas) e inclusiones de ribonucleoproteína viral (cabezas de flecha) que no alcanzan a ser cuerpos de Negri. Barras = 1 μ m.

Figura 4-16: Ultraestructura de neuronas apoptóticas en médula espinal de ratones infectados con virus CVS.



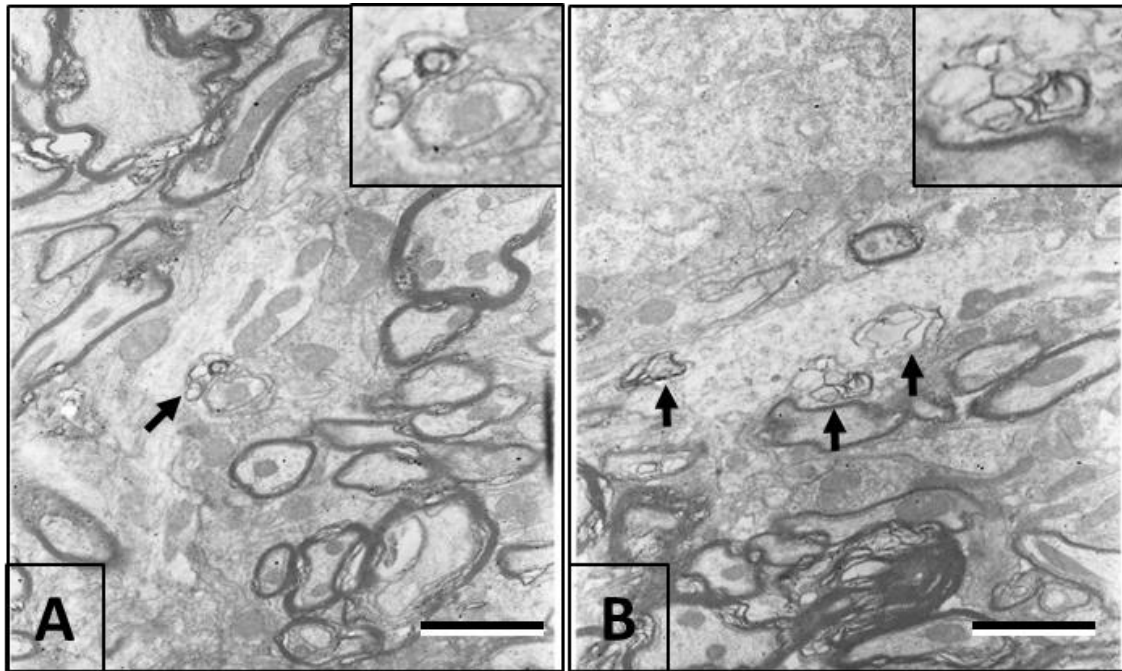
A y B. Cuerpos apoptóticos (CA) ocupando gran parte del área del soma de las neuronas dentro de las cuales se formaron. **C y D.** Neuronas apoptóticas con diferentes grados de fragmentación nuclear y condensación del citoplasma. Los recuadros en color azul corresponden a cortes semifinos (600 nm de espesor) de tejido incluido en resina plástica, coloreado con azul de toluidina y fotografiado en el microscopio óptico en 40X. Barras = 1 μ m.

Figura 4-17: Imágenes ultraestructurales de la médula espinal en ratones infectados con virus 'calle'.



A. Núcleo (Nu) y pericarion (P) de una motoneurona que exhibe un aspecto similar al de una neurona de un ratón control. **B.** Fragmento del núcleo y el pericarion de una motoneurona que contiene un cuerpo de Negri (CN). No obstante la célula exhibe una imagen con aspecto normal. Arriba en la ampliación del recuadro se describe en detalle el borde del CN para observar algunas partículas virales **C.** Partículas virales (flechas) localizadas dentro del neuropilo que rodea a una neurona de aspecto normal. **D.** Axones (Ax) en corte transversal mostrando degradación parcial de la mielina en algunos de ellos (flechas). Barras = 1 μm .

Figura 4-18: Ultraestructura figuras semejantes a mielina en la médula espinal de ratones infectados con virus CVS.

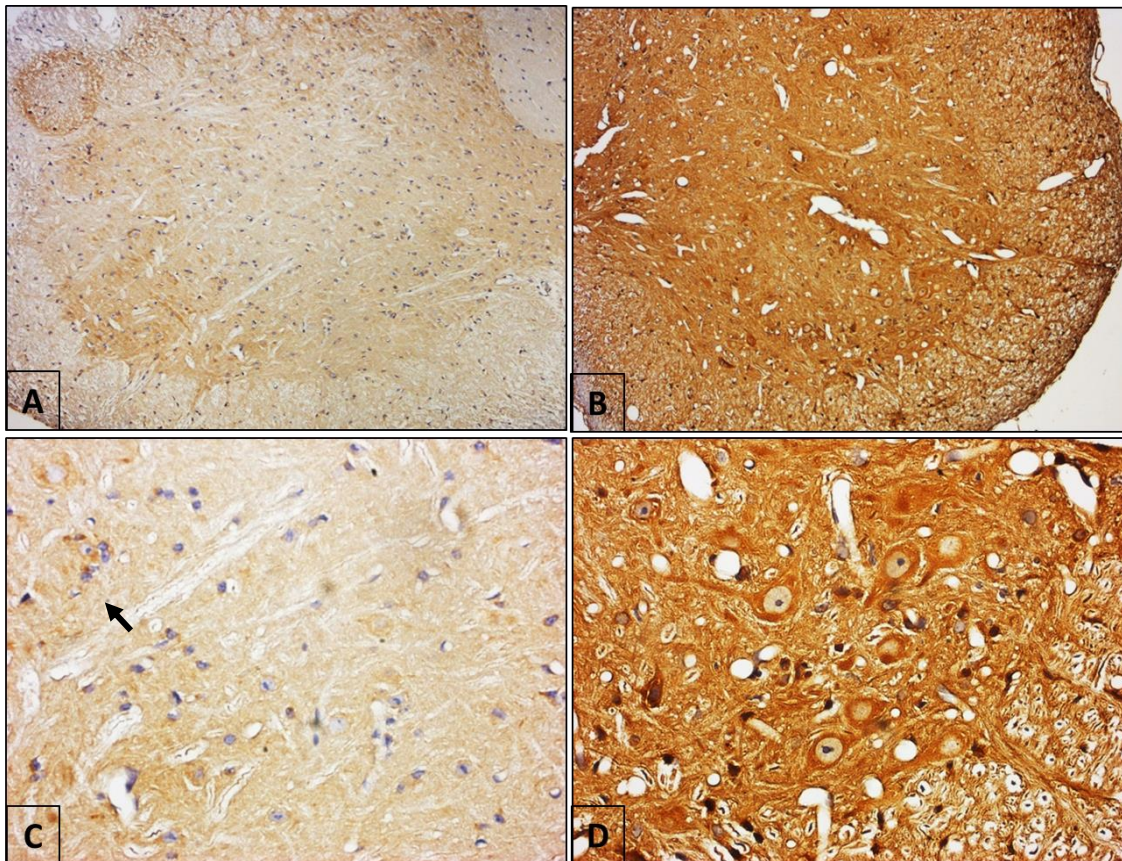


A y B. Las flechas indican figuras semejantes a mielina (figuras mielínicas) formadas por láminas concéntricas dentro de las dendritas de la médula espinal de ratones inoculados con virus fijo de la rabia. Barras = 1 μ m.

4.7. Inmunohistoquímica para Bax.

Debido al hallazgo de neuronas con características ultraestructurales de apoptosis se procesaron fragmentos de médula espinal de dos animales inoculados con virus 'fijo' y un control para inmunohistoquímica de Bax. En el grupo control hubo una débil marcación en el citoplasma de neuronas del asta ventral y zona intermedia. En la medula espinal de ratones infectados con el virus se detectaron neuronas inmunorreactivas a Bax en el asta ventral; por el tamaño ($\geq 30 \mu\text{m}$) algunas de ellas posiblemente correspondían a motoneuronas. La marcación se delimitó principalmente al pericarion y algunas dendritas (Figura 4-19).

Figura 4-19: Inmunohistoquímica para Bax en ratones inoculados con virus CVS.



A y C. Ratón control. Inmunorreactividad débil posiblemente debido a 'ruido de fondo' aunque parece haber algunas escasas estructuras Bax+ (flechas). **B y D. Ratón infectado.** La inmunorreactividad para Bax fue acentuada, fácilmente distinguible del control, en el pericarion (flechas) y en el neuropilo. Imágenes panorámicas (A y C) en 10X. Ampliaciones (B y D) en 40X

5. Discusión.

5.1. Distribución de la Infección con el virus de la rabia en la médula espinal.

Después de la inoculación intramuscular del virus en las extremidades posteriores de ratones, los antígenos virales se localizaron inicialmente en el asta ventral de la médula lumbar, en núcleos correspondientes a motoneuronas. El núcleo Hm9 contiene específicamente motoneuronas que inervan a los músculos isquiotibiales (47,49,102). La evidencia neuroanatómica de distribución de las neuronas inmunorreactivas aquí descrita sugiere que a partir de la médula lumbar el virus asciende, mediante transporte axonal retrógrado, por la vía propioespinal. Esto se deduce por la localización de las neuronas en las que inicialmente se observaron antígenos en la médula torácica y la médula cervical.

Los núcleos 8Sp de estos segmentos medulares contienen neuronas propioespinales con axones largos descendentes. Estas neuronas envían proyecciones monosinápticas directamente hasta los núcleos propioespinales inferiores y las neuronas motoras lumbares de la lámina 9 (103,104). En otras palabras, el virus inoculado en los músculos isquiotibiales es conducido a la médula espinal hasta las motoneuronas de la lámina 9 y asciende a través de los axones descendentes de las neuronas propioespinales de la lámina 8 hasta los niveles torácico y cervical. Además, parte de las proyecciones de las neuronas propioespinales de la lámina 8 son comisurales (103); estas podrían contribuir a la rápida diseminación del virus al lado contralateral. Estos resultados son evidencia de la mayor afinidad del virus de la rabia por la vía motora y del transporte axonal retrógrado como su principal mecanismo de diseminación. Las neuronas propioespinales

descendientes se consideran premotoras (104) y contribuyen a la coordinación de los reflejos y la locomoción (103).

Aquí se revelan detalles, aparentemente no conocidos, sobre el transporte del virus de la rabia a través de la médula espinal. Son escasos los estudios en rabia que se enfocan en esta parte del sistema nervioso. La mayoría de ellos corresponden a histopatología post mórtem (95,97,105) y otros se limitan a informar el tiempo transcurrido entre la inoculación periférica del virus y su aparición en la médula lumbar pero sin precisar el sitio exacto y sin hacer seguimiento posterior a su ascenso a través de los diferentes niveles (28,94,106,107,108,109), además los intervalos de observación reportados son cada 24 horas o más, a partir de la inoculación, mientras que en el presente estudio se hizo un seguimiento cada 8 horas. Esto facilitó la detección de las primeras neuronas infectadas en cada uno de los niveles de la médula espinal.

En la revisión bibliográfica no se encontraron estudios similares que detallen el ascenso del virus por la vía motora, desde la médula lumbar a la médula cervical, con excepción del trabajo realizado recientemente con un virus de rabia modificado genéticamente (desprovisto de la proteína G), utilizado sólo como trazador monosináptico, porque ha perdido la capacidad de reproducirse y de pasar de una neurona a otra por vía transináptica (104). Con este trazador se demostraron las conexiones monosinápticas entre las neuronas propioespinales de la médula torácica y la médula cervical con las motoneuronas lumbares. Un aspecto particular de este virus recombinante utilizado como trazador es que el recorrido entre la médula lumbar y la médula cervical, en los ratones utilizados, tardó aproximadamente una semana.

Por otra parte, Ugolini sostiene de acuerdo con sus experimentos en ratas, cobayos y primates, que el ingreso del virus desde la periferia hasta la médula espinal ocurre exclusivamente a través de fibras motoras. Esto lo ha demostrado inoculando músculos que contienen abundantes fibras sensoriales, motoras y autonómicas. En ningún caso encontró diseminación del virus por vía sensorial o autonómica, y sugiere que los reportes sobre la posible entrada del virus de la rabia por vía sensorial en ratones, podrían explicarse por una mayor susceptibilidad de esta especie al virus CVS, puesto que esta cepa viral fue originalmente adaptada en ratón (25,110). Esta mayor susceptibilidad también explicaría el transporte más rápido del virus desde la periferia hasta la médula

espinal y desde las motoneuronas hasta las neuronas propioespinales descendentes hallado aquí en ratones.

No obstante, algunos autores han reportado susceptibilidad de las neuronas sensoriales a la infección y transporte axonal anterógrado del virus en condiciones 'in vitro' (74,111), así como su posible ingreso al sistema nervioso central a través de la vía sensorial (26,112). Además, existe un virus recombinante de la rabia, obtenido por delección de la proteína G, que puede infectar neuronas sensoriales y ser transportado en dirección anterógrada (28,113). Ahora bien, la diseminación del virus por la ruta intramuscular parece ser más eficiente, si se tiene en cuenta que en el estudio más reciente que reportó el ingreso del virus CVS por la vía sensorial en ratones, se informa un tiempo postinoculación de 96 horas para su transporte desde la periferia hasta la médula espinal lumbar (26)

Finalmente, es importante destacar el hecho de que la diseminación del virus, a través de la médula espinal, no se manifiesta en disfunción motora sino hasta bien avanzada la enfermedad, cuando el virus ya ha invadido áreas motoras superiores del encéfalo. Previamente se había demostrado el efecto de la infección, en fase avanzada de la enfermedad, sobre la expresión de proteínas reguladoras del metabolismo del calcio en la médula espinal (87). Que el virus de la rabia no genere alteraciones funcionales, como resultado de su dispersión temprana a través de la médula espinal, es coherente con otros estudios que han demostrado la estrategia del patógeno para asegurar su diseminación a través de todo el tejido nervioso, sin afectar la función neuronal sino hasta bien avanzada la enfermedad (44,86,114) Esto es particularmente importante en la médula espinal para permitir el avance de la infección hacia el encéfalo.

5.2. Marcadores del citoesqueleto y patología dendrítica asociada a la infección con el virus de la rabia.

Los neurofilamentos tienen como función proporcionar resistencia mecánica a la célula, así como regular la distribución de proteínas y la transmisión de señales intracelulares. La función de los NF-H es fundamentalmente estructural; participa en el crecimiento radial de los axones durante el desarrollo, el mantenimiento del calibre del axón y la transmisión de

impulsos eléctricos a lo largo de los axones, es decir, en la velocidad de conducción nerviosa (64). Por su parte la MAP2 se encarga de la estabilización de los microtúbulos, inhibición de la polimerización, aumento de la rigidez de los microtúbulos y modulación de la iniciación de las neuritas. Además participan en la formación de entrecruzamientos entre los microtúbulos y los neurofilamentos (63).

En esta investigación se demostró que la infección con el virus de la rabia genera un aumento de la inmunorreactividad de MAP2 y NF-H en la médula espinal. Recientemente se había reportado aumento de la expresión de MAP2 en la corteza cerebral de ratones inoculados con los dos tipos de virus de la rabia (92) y la sobreexpresión del gen de la MAP2 en pacientes que presentaron rabia encefálica (93). El aumento de expresión de una proteína como consecuencia de la infección con el virus de la rabia ya había sido reportado. En la corteza cerebral (84) en el cerebelo (82,115) y en la médula espinal de ratones infectados con rabia, se encontró aumento de parvoalbúmina (PV) una proteína de unión a calcio (87). Prośniak y colaboradores hallaron que al menos el 1.4% de los genes (16 de los genes evaluados en el estudio) aumentaron su expresión en el cerebro de ratones inoculados con el virus CVS de la rabia (116).

Sin embargo, Song y colaboradores no reportaron variación cualitativa en la inmunorreactividad de MAP2 en neuronas piramidales del hipocampo de ratones (90). En otros estudios se ha encontrado disminución de inmunorreactividad de MAP2 y NF-H en neuronas infectadas *in vitro* (89), así como pérdida de la expresión de MAP2 en neuronas de la corteza cerebral y el pedúnculo cerebelar de ratones (10) y pérdida de filamentos de actina en el hipocampo de ratones (90). Posiblemente estas diferencias se deben al tipo y la virulencia de las cepas virales utilizadas en las investigaciones (10). Pero los análisis de proteómica de estas proteínas en cerebros humanos infectados con rabia (93) respaldan el aumento de expresión de MAP2 y NF-H aquí reportado.

La sobreexpresión de MAP2 y NF-H puede ser un mecanismo que facilite la diseminación del virus. Se ha sugerido que el citoesqueleto juega un papel fundamental en el transporte retrogrado del virus de la rabia (117,118) y existe la posibilidad de que el virus tenga la capacidad de ser transportado activamente a lo largo de microtúbulos, siendo capaz de interactuar con miembros de la familia de las dineínas (28,119)

Uno de los posibles mecanismos que facilitan el transporte del virus de la rabia por vía retrograda es la unión a los receptores p75NTR; estos facilitan la internalización del virus por la vía p75. Esta vía aumenta las tasas de transporte por que activa diferentes cascadas de señalización como resultado de la unión de varios ligandos o interacciones con diversos co-receptores que regulan a la alta el transporte axonal retrógrado (27). Es factible que la unión del virus de la rabia a clústeres p75NTR en la membrana celular promueva el reclutamiento y la movilización tanto de los microtúbulos como de las dineínas (27). Además se ha demostrado que la polimerasa L del virus de la rabia forma un complejo de unión con la cadena ligera de dineína 1 (DLC1). Este complejo está implicado en la asociación y reorganización así como en la modificación postraduccional de los microtúbulos, y en la regulación de la transcripción primaria del virus de la rabia (120).

De igual manera se ha demostrado asociación entre DLC1 y las proteínas MAP por medio de la unión directa a los dímeros de tubulina (121). Esto sugiere que no sólo el virus usa la red de microtúbulos durante la entrada, si no que manipula activamente el citoesqueleto y las proteínas asociadas para lograr un transporte rápido y eficiente (120). Posiblemente la sobreexpresión de MAP2 y NF-H puede ser inducida por DLC1 o por expresión de una proteína del virus, al igual que sucede con la modificación postraduccional de los microtúbulos asociadas a DLC1-polimerasa L (120) y en el transporte mediado por p75NTR (27). Todo esto como un mecanismo que en conjunto facilite y acelere el transporte del virus. Recientemente se ha reportado que otro virus, el VIH1, induce la formación de microtúbulos para facilitar la infección (122).

Por lo general se asocia la pérdida de la expresión de MAP2 con alteraciones en la morfología dendrítica (91). Por el contrario, con los resultados aquí presentados, parece confirmarse que en rabia hay patología dendrítica asociada con aumento en la MAP2. La técnica de Golgi Cox reveló imágenes que muestran alteraciones morfológicas en neuronas del asta ventral de la médula espinal, en particular, pérdida dendritas y disminución de su longitud. Resultados similares se reportaron en neuronas piramidales de la corteza cerebral de ratones (39,46,92) También en Síndrome de Down se ha establecido la asociación entre aumento de MAP2 y patología dendrítica (92,123)

En ratones transgénicos pequeños aumentos de expresión de NF-H generaron un mayor contenido de neurofilamento total y axones mielinizados más grandes, mientras que los incrementos elevados de NF-H generaron la disminución del contenido total de neurofilamentos e inhibieron fuertemente el crecimiento (124). La sobreexpresión de NF-H induce anomalías en la organización y formación de neurofilamentos, que pueden causar alteraciones en la morfología y el metabolismo celular (125). En la médula espinal de ratones con sobreexpresión de NF-H y NF-M (medium) se demostró que el aumento de una o ambas proteínas conduce a la agregación de NF y una segregación de la red NF y los microtúbulos, generando una reducción drástica de la arborización dendrítica de las motoneuronas (126). La patología dendrítica en rabia también se había corroborado mediante la observación de la ultraestructura de dendritas distales de neuronas piramidales de la corteza cerebral donde se evidenció que el virus altera la organización de los microtúbulos e induce la aparición de figuras similares a mielina (38,40). En la médula espinal también se hallaron algunas figuras mielínicas aunque no del tamaño y características encontradas en las neuronas corticales.

Es posible que en etapas iniciales de la infección por rabia el aumento de MAP2 y NF-H favorezca la velocidad de transporte del virus, pero en etapas avanzadas este aumento progresivo provoca alteraciones en el citoesqueleto que se reflejan en la morfología celular. Estos cambios pueden deberse a la acumulación de NF-H en las neuronas, especialmente en las motoras, lo que impide la interacción entre el NF y los microtúbulos (126,127). En esta investigación se confirmó la posible asociación de la sobreexpresión de MAP2 y NF-H con la patología dendrítica en rabia. Sin embargo, es necesario seguir profundizando en la participación de los receptores neuronales, la regulación postraduccional del citoesqueleto en el transporte del virus de la rabia y su relación con la patología dendrita como mecanismos de disfunción neuronal y un modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas.

5.3. Efecto de la infección rábica sobre marcadores de neuronas colinérgicas, gabaérgicas y glicinérgicas.

Aunque se ha considerado la disfunción neuronal como uno de los mecanismos causales de la muerte en rabia, son pocos los estudios que han evaluado el efecto de la infección en los sistemas de neurotransmisión (44,45,82,83,115). En el desarrollo de este trabajo se evaluó el efecto del virus de la rabia en el sistema colinérgico, mediante el estudio de la inmunorreactividad de colina acetiltransferasa (ChAT), enzima que sintetiza la ACh y el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), proteína responsable del transporte de la acetilcolina través de las vesículas sinápticas. Estos son considerados los principales marcadores para identificar células colinérgicas (51). Se demostró que la infección afecta la expresión estos marcadores generando su pérdida notable en el asta ventral de la médula espinal, especialmente en la lámina IX donde se ubican las motoneuronas.

Jackson (1993) no encontró efecto de la infección con virus CVS sobre la actividad enzimática de la ChAT y AChE, en la corteza cerebral o el hipocampo de ratones infectados con virus CVS (76). Por lo tanto, interpretó que la disfunción del sistema colinérgico es poco probable en el modelo de rabia en ratón. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación demuestran un efecto sobre el sistema colinérgico al menos en neuronas de la médula espinal. Esto podría estar relacionado con la afinidad que tiene el virus de la rabia por los receptores nicotínicos de la acetil colina (128). De hecho, esta característica del virus ha sido utilizada para realizar identificación y trazado de interneuronas colinérgicas premotoras en la médula espinal (129).

Por otra parte, no se encontró efecto aparente sobre la inmunorreactividad de GABA y glicina ni sobre la expresión de la enzima GAD-67. Por lo tanto el virus de la rabia parece afectar la neurotransmisión inhibitoria en la médula espinal a diferencia de lo que se ha reportado en estudios de áreas encefálicas (79,81,82,115) o en neuronas corticales en cultivo (80) donde hay evidencia de que la infección afecta la actividad del GABA. Previamente no se tenía información sobre el efecto de la rabia en la neurotransmisión glicinérgica quizás por la escasez de estudios de rabia en la médula espinal.

Una alternativa para identificar neuronas gabaérgicas es el uso de dos marcadores neuronales: calbindina (CB) y parvalbúmina (PV), dos proteínas de unión a calcio que se expresan en neuronas gabaérgicas (84,130). La infección con el virus de la rabia produce disminución en la expresión de CB la corteza cerebral y el estriado y aumento de la expresión de PV en las mismas áreas (84,85). Un resultado similar se obtuvo en la médula espinal de ratones (87). Por lo tanto, no aparece haber una relación directa entre el efecto de la infección sobre la expresión de las dos proteínas y la neurotransmisión gabaérgica. Adicionalmente, en las células de Purkinje del cerebelo de ratones inoculados con virus de rabia CVS no se afectó la expresión de CB, lo cual llama la atención, puesto que estas neuronas son gabaérgicas y contienen más cantidad de CB que cualquier otra célula del sistema nervioso (88).

Los neurotransmisores acetilcolina (ACh), GABA y glicina desempeñan importantes papeles funcionales en la médula espinal. Las neuronas ACh⁺ representan la principal salida de información hacia el sistema muscular y la ACh es también un modulador del procesamiento sensorial (131). Las interneuronas inhibitorias gabaérgicas y glicinérgicas son también un componente crítico para el procesamiento sensorial y la actividad motora. El GABA y la glicina forman parte de una gama de sistemas neuromoduladores (inhibitorios) que regulan la salida final del impulso motor desde las neuronas motoras del SNC, que aseguran que el movimiento sea suave, preciso y adaptado a las exigencias ambientales y organizacionales (58,132). El efecto de la rabia sobre los marcadores ChAT y VACHT podría reflejar un desbalance en la neurotransmisión colinérgica que explicaría, en parte, la parálisis de las extremidades observadas en los ratones infectados.

Para que se genere el movimiento de los músculos en los vertebrados, es necesario un correcto funcionamiento de la unión neuromuscular, está formada por las α -motoneuronas y las fibras musculares esqueléticas; la sinapsis en la placa neuromotora es mediada por la acetilcolina (133). Las α -motoneuronas corresponden a células ACh positivas de la lámina IX de la médula espinal (51), el área donde se evidenció pérdida de los marcadores VACHT y ChAT asociada a la infección con el virus de la rabia. Se ha sugerido que los cambios en la expresión o el tráfico de VACHT a las vesículas sinápticas puede regular la cantidad de ACh secretada por las terminaciones nerviosas (133,134), además la pérdida

ChAT la enzima que sintetiza la ACh, sugiere que la parálisis en rabia se debe a la no disponibilidad de acetilcolina en la unión neuromuscular.

GABA y glicina son los neurotransmisores inhibitorios primarios en la médula espinal de mamíferos, pero difieren en sus funciones reguladoras de la excitación neuronal durante el ensamblaje del circuito locomotor en mamíferos (135). El equilibrio entre la excitación y la inhibición está mediado por una variedad de poblaciones de interneuronas que controlan muchas de las propiedades, funciones y los parámetros de la salida de efecto motor (136). Se ha demostrado que las neuronas localizadas en el cuerno dorsal, las motoneuronas, las células de Renshaw, y algunas otras neuronas del asta ventral, reciben entradas sinápticas tanto gabaérgicas como glicinérgicas (58). En este sentido la acción de las α motoneuronas está regulada por la interacción con las interneuronas gabaérgicas y glicinérgicas, lo que podría ser otro factor que intervenga en las alteraciones del movimiento asociadas a la infección con el virus de la rabia.

5.4. Muerte celular asociada a la infección con el virus de la rabia.

La proteína NeuN se ha reconocido como un marcador universal para las neuronas aunque unos pocos tipos de células neuronales no lo expresan (69,137). Además de representar un marcador de neuronas maduras, es útil para examinar las etapas de maduración y diferenciación del SNC. La inmunohistoquímica para NeuN puede ser aplicada en estudios neuropatológicos para el fisiológico del SNC; la disminución de la inmunorreactividad para NeuN se puede asociar a degeneración neuronal (71).

La NeuN es un excelente marcador para el estudio de enfermedades neurológicas que inducen cambios morfológicos difíciles de detectar, como en la rabia (72). La pérdida de marcación para NeuN eventualmente es un indicativo de muerte celular (69). En esta investigación se demostró que el virus CVS de la rabia inoculado por vía intramuscular provoca disminución en la inmunorreactividad a NeuN en el asta ventral de la médula espinal de ratones y se determinó que en los animales infectados había un menor número de células NeuN+.

Recientemente Rengifo y colaboradores (2016) demostraron disminución significativa de neuronas NeuN+ en la corteza cerebral de ratones inoculados por vía intracerebral (72). Por el contrario, estos cambios no se reportaron en la corteza de ratones inoculados por la ruta intramuscular. En contraste, en este trabajo se encontró pérdida de NeuN en la médula espinal en animales inoculados por la vía intramuscular. Una posible explicación sería el mayor tiempo que dura la infección de las neuronas de la médula espinal respecto a las neuronas de la corteza cerebral. La pérdida de inmunorreactividad a NeuN, inducida por el virus fijo, podría estar relacionada con el hecho de que este tipo de infección experimental en ratones induce muerte neuronal por apoptosis (45)

La apoptosis en rabia no es un evento común, se ha considerado que la preservación de la integridad de la red neuronal es crucial para que el virus sea transmitido. La invasión del sistema nervioso por el virus parece ser el resultado de la supervivencia de las neuronas infectadas. Esta estrategia incluye la protección contra el virus mediada por la apoptosis y la destrucción de las células T que invaden el SNC en respuesta a la infección (138). En este estudio se encontró, mediante inmunohistoquímica de Bax y microscopía electrónica, evidencia de apoptosis a causa de la infección con virus fijo. Hay evidencia experimental (*in vitro*) de que las motoneuronas de la médula espinal de ratas sobreviven a la infección por el virus de la rabia debido a que la inducción viral de la apoptosis se retrasa en estas neuronas (139).

Se ha reportado apoptosis en diferentes regiones del encéfalo, en condiciones experimentales especiales, en las que se han utilizados virus o ratones genéticamente modificados (42,140). Sin embargo, no se demostró apoptosis en la médula espinal cuando el virus fijo se inoculó por vía intracerebral (36) o intramuscular en ratones (42,141,142), y no se ha encontrado apoptosis en pacientes humanos o en animales con infección natural del virus de la rabia (41,43,95). Este sería entonces el primer reporte de apoptosis en la médula espinal causado por la infección con virus fijo de la rabia inoculado por vía intramuscular y quizás este fenómeno pueda tener alguna relación con el efecto de la rabia sobre el sistema motor en las extremidades de los ratones infectados.

Recientemente se ha demostrado que el virus CVS induce apoptosis a través de vía mitocondrial. El virus bloquea la activación de Bax en las primeras etapas de la infección; mientras que la proteína M se dirige hacia las mitocondrias e induce la apoptosis en las últimas etapas de la infección (143). De hecho se ha demostrado que ratones mutantes

(*knock out*) para Bax presentan menos cantidad de células apoptóticas que los ratones normales cuando son infectados con virus de la rabia (144).

5.5. Efecto de la infección con virus de la rabia en la ultraestructura neuronal.

Las primeras descripciones de infección con el virus de rabia tipo calle se realizaron en los años 60. En las publicaciones se describen partículas virales de 100 x 120 nanómetros rodeadas por una doble membrana. Estos resultados se obtuvieron mediante la inoculación por vía intracerebral de ratones de 2 a 3 días de nacidos (145,146). Las partículas virales descritas aquí presentaron forma de bala o circulares (en cortes transversales de los viriones) con un ancho de 70,8 nanómetros y un largo de entre 80 y 120 nanómetros tanto en la infección con el virus fijo como con el virus calle.

Se considera que el cuerpo de Negri está presente sólo en las infecciones con virus calle, mientras que el virus fijo genera matrices de ribonucleoproteína viral más pequeñas en volumen. Una explicación podría ser que el virus CVS afecta más rápidamente a los animales y lesiona a las neuronas de tal manera que no se logra el desarrollo del cuerpo de Negri (147). En este estudio sólo se observaron algunas pequeñas matrices de ribonucleoproteína en neuronas del asta ventral de la médula espinal en muestras infectadas con virus fijo. En algunas neuronas infectadas con virus calle fue evidente la formación de cuerpos de Negri con partículas virales a su alrededor.

En este trabajo también se confirmó la diferencia entre la ultraestructura del tejido nervioso infectado con virus fijo y el infectado con virus calle, tal como ha sido descrita por otros autores (37,147). Sólo en muestras de animales inoculados con virus fijo se observaron los rasgos ultraestructurales característicos de apoptosis (148,149,150) tal como los describieron Miyamoto & Matsumoto en 1967, aunque para ese entonces aún no se había acuñado ese término (147), que se conoció a partir de 1972 (148). Los rasgos ultraestructurales apoptóticos inducidos por el virus fijo de la rabia también han sido reportados por otros autores (140,151). Es importante anotar que la microscopía electrónica es considerada el “estándar de oro” para el diagnóstico de apoptosis (149,150). En esta trabajo se pudo establecer, quizás por primera vez, la presencia de apoptosis en

médula espinal de ratones inoculados por vía intramuscular, la ruta natural de infección. Inicialmente con el microscopio electrónico y luego confirmado mediante inmunohistoquímica con un marcador de células apoptóticas (Bax).

Otra de las características de la infección descrita en esta investigación es la degradación de la mielina en los axones, más acentuada por el virus fijo pero también presente en las muestras de animales infectados por virus calle. Otros autores, en estudios de nervios periféricos humanos así como de ratones y ratas infectados con virus calle, reportaron desmielinización segmentaria y remielinización, degeneración Walleriana, pérdida de la fibra mielínica y pérdida axonal (152,153,154). Valdría la pena explorar si la destrucción de la mielina también ocurre en los nervios motores periféricos como factor desencadenante de la parálisis de los miembros inferiores.

Recientemente se ha reportado la escasez de mitocondrias, pérdida marcada de microtúbulos, formación de vacuolas y presencia de unas raras estructuras electrodensas dentro de las dendritas distales (figuras de mielina) de las células piramidales corticales en ratones infectados con virus de rabia tipo calle (38,40). Durante la observación y análisis ultraestructural del presente estudio no se encontraron características similares con excepción de algunas figuras mielínicas pero de menor tamaño.

6. Conclusiones

1. Los resultados aquí obtenidos sugieren que el virus de la rabia ingresa a la médula espinal través de las motoneuronas de la región lumbar y utiliza la vía propioespinal descendente para su transporte axonal retrógrado hasta alcanzar la región cervical.
2. La infección con virus de la rabia generó pérdida en la expresión de los dos principales marcadores de neuronas colinérgicas, ChAT y VACht. Esto puede ser evidencia de la afectación del sistema colinérgico, por lo menos en la médula espinal, lo que podría estar asociado a los signos de parálisis en las extremidades de los animales inoculados con el virus. Por el contrario, esta infección no parece afectar la síntesis de los neurotransmisores inhibitorios GABA y glicina en la médula espinal.
3. Las proteínas de citoesqueleto MAP2 y NF-H incrementaron su expresión dentro de la médula espinal de ratones inoculados con el virus de la rabia mientras que la infección generó pérdida de dendritas. Esto confirma resultados previos hallados en el encéfalo que relacionan el aumento de la expresión de estas proteínas con patología dendrítica en rabia.
4. Con microscopía electrónica e inmunohistoquímica para Bax se demostró la ocurrencia de apoptosis en la médula espinal de ratones inoculados con virus fijo de la rabia por la ruta intramuscular. Esto podría estar relacionado con la disminución en el número de neuronas NeuN+. Probablemente este sea el primer reporte de este hallazgo.
5. Se confirmó la diferencia entre la ultraestructura del tejido nervioso infectado con virus calle y el afectado por virus fijo. Además, los hallazgos ultraestructurales generados por la infección en la médula espinal fueron diferentes a los que previamente se habían descrito en neuronas de la corteza cerebral.

A. Anexo: Protocolo de bioseguridad para la inoculación y manejo de ratones con el virus de la rabia

1. El investigador principal y demás personas que hacen parte de la línea de investigación y llevan a cabo la manipulación de los animales, han recibido el esquema completo de vacunación antirrábica y, cada 6 meses, se someten a prueba de valoración de los títulos de anticuerpos, realizada por el Grupo de Virología del INS.
2. Las alícuotas de virus de la rabia utilizadas para inocular los animales son suministradas por el Grupo de Virología del INS y se transportan refrigeradas hasta el bioterio directamente por quien llevará a cabo el procedimiento, no por terceras personas. Solamente el investigador principal del proyecto hará las inoculaciones.
3. En el bioterio (sala de alta seguridad) la manipulación del virus (diluciones) se lleva a cabo dentro de la cabina de flujo laminar.
4. La inoculación del virus en los animales también se realiza dentro de la cabina de flujo laminar. Este es el procedimiento de más alto riesgo (puede haber riesgo de pincharse con la aguja de la jeringa de inoculación). Sólo el investigador principal lleva a cabo las inoculaciones. Se utiliza un doble de juego de guantes quirúrgicos. La aguja de inoculación (calibre 27) tiene apenas 0,5 mm de longitud. Esto disminuye el riesgo y facilita una inoculación muy precisa en el sitio deseado.
5. El experimentador trabaja con un equipo de bioseguridad que consta de un traje previamente esterilizado (suministrado por el bioterio) gafas, tapabocas y guantes quirúrgicos.
6. Una vez inoculados los ratones se distribuyen en las cajas y se trasladan al área asignada para animales inoculados con el virus de la rabia.
7. Diariamente se llevan a cabo observaciones y toma de notas sobre el comportamiento de los animales inoculados y sus controles.

8. Para llevar a cabo la fijación por perfusión, los animales se trasladan hasta la cabina de flujo laminar, se inocula el anestésico (ver numeral 7.2 del protocolo) y, 3 minutos después se inicia el proceso de disección. Los ratones se inmovilizan sobre una tabla de madera o icopor, utilizando alfileres en el área plantar de sus 4 extremidades, dejando su lado ventral hacia arriba. Este procedimiento, además, permite probar que los animales están bajo anestesia profunda.
9. A continuación se lleva a cabo una incisión de la piel, los músculos torácicos y abdominales y los huesos del tórax para dejar al descubierto el corazón. Este debe conservar su latido para que la perfusión pueda ser exitosa. La manipulación de los animales previa a la perfusión y durante la misma implica bajo riesgo puesto que el virus es estrictamente neurotrópico (sólo se encuentra en el tejido nervioso) y en roedores de laboratorio está documentado que no se transmite a través de la saliva (mordedura).
10. Para llevar a cabo la perfusión se introduce una aguja (de una jeringa de tuberculina) en el ápice del ventrículo izquierdo en sentido diagonal hasta la unión de la aorta con la aurícula derecha. Previamente se ha ensamblado la aguja con la manguera de una bomba de perfusión con un calibre específico para hacer perfusión en ratones. Inicialmente se deja circular una solución salina de tampón de fosfatos durante 5 minutos (aproximadamente 50 ml) para extraer la sangre. A continuación se deja circular la solución fijadora (paraformaldehído 4%) durante 10 minutos (aprox. 100 ml).
11. Una vez perfundido el animal, se separa la cabeza y con unas tijeras finas se corta el cráneo desde atrás hacia adelante, se extrae el encéfalo y se coloca en una solución con el fijador (paraformaldehído 4% o paraformaldehído 4% más glutaraldehído 1). Esta es la parte del animal que se lleva al laboratorio de microscopía. El resto del animal se deja para ser incinerado y no representa riesgo por cuanto está desinfectado con el líquido de perfusión

B. Anexo: Inmunohistoquímica para rabia

1. Realizar cortes en vibrátomo de 50µm. Se recogen en cajas de Petri de 1,5ml con tampón fosfato salino (PBS); se dejan en PBS toda la noche.
2. Tratamiento con NH₄Cl 0,05M (0,03gr en 10ml de PBS) (30 min).
3. 3 lavados en PBS (10', 5' 5')
4. Inhibición de la peroxidasa endógena (H₂O₂ 3% en PBS) (30 min).
5. 3 lavados en PBS (10', 5' 5')
6. Bloqueo: se lleva a cabo en la siguiente solución. (30 min).

9,4 ml de PBS

300µl de suero Normal de Caballo

300µl de BSA (Albúmina Sérica Bovina)

120µl de Tritón

NO LAVAR

7. Incubación de anticuerpo primario (policlonal de rabia en conejo) (2 hr).

Dilución 1:1000

Partiendo de una solución 1/10

900µl agua ultra pura + 100 de primario 1/10 = 1000 µl primario 1/100

9000µl de PBS + 1000 µl primario 1/100 = 10ml de primario 1/1000

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

9. Pasar al anticuerpo secundario anti mouse(1hora)

Dilución: 1:600

Partiendo de una solución 1/200

6672 μ l de PBS + 3328 μ l de secundario 1/200 =10ml secundario 1/600

10. 3 lavados con PBS (10'c/u)

11. Pasar a solución ABC (complejo avidina – biotina) (1hora)

Preparación para cuatro cajas: preparar 30min antes

1gota de A + 1 gota de B x cada 5 ml de PBS

12. 3 lavados en PBS (10', 5', 5')

13. Revelar con diaminobencidina (DAB-Nikel) kit

14. Lavar con PBS

15. Montar en láminas pretratadas, dejar secar y montar con citorresin

C. Anexo: Inmunohistoquímica para marcadores neuronales

1. Realizar cortes en vibrátomo de 50µm. Se recogen en cajas de Petri de 1,5ml con tampón fosfato salino (PBS); se dejan en PBS toda la noche.
2. Tratamiento con NH₄Cl 0,05M (0,03gr en 10ml de PBS) (30 min).
3. 3 lavados en PBS (10', 5' 5')
4. Inhibición de la peroxidasa endógena (H₂O₂ 3% en PBS) (30 min).
5. 3 lavados en PBS (10', 5' 5')
6. Bloqueo: se lleva a cabo en la siguiente solución. (30 min).

9,4 ml de PBS

300µl de suero Normal de Caballo

300µl de BSA (Albúmina Sérica Bovina)

120µl de Tritón

NO LAVAR

7. Incubación de anticuerpo primario (Toda la noche)

Monoclonales:

Anti-NeuN dilución 1:1000; anti-NF-200 dilución 1:1000

Policlonales:

Anti-MAP2 dilución 1:2500; anti-VACht dilución 1:1000; anti-VACht dilución 1:1000 (PAP); anti-ChAT 1:1000

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

9. Pasar al anticuerpo secundario (2 horas)

Anti mouse dilución 1:400 (para anticuerpos monoclonales)

Anti rabbit dilución 1:600 (Para anticuerpos policlonales)

Anti Goat dilución 1:400 (para el VACht método PAP)

10. 3 lavados con PBS (10'c/u)

11. Pasar a solución ABC (complejo avidina – biotina) (2 horas) (excepto VACht PAP)

Preparación para cuatro cajas: preparar 30min antes

1gota de A + 1 gota de B x cada 5 ml de PBS

12. 3 lavados en PBS (10', 5', 5')

13. Revelar con diaminobencidina (DAB-Nikel) kit (todas las muestras)

14. Lavar con PBS

15. Montar en láminas pretratadas, dejar secar y montar con citorresina

D. Anexo: Prueba de normalidad (shapiro-wilks modificado)

InfoStat permite probar si la variable en estudio tiene distribución normal. Las Hipótesis: H_0 : las observaciones tienen distribución normal; versus H_1 : las observaciones no tienen distribución normal. La Interpretación: valores inferiores ($p < 0,05$) evidencia para RECHAZAR el supuesto de distribución normal. Valores superiores ($p > 0,05$) evidencia para ACEPTAR el supuesto de distribución normal.

Marcador	Variable	Media	DS	W*	p-Valor
NeuN Densitometría	Control	136,50	10,38	0,89	0,3989
	Infectado	148,10	17,98	0,88	0,3824
NeuN Conteo	Control	132,25	20,47	0,94	0,6458
	Infectado	72,75	2,22	0,96	0,7238
GABA	Control	111,32	24,76	0,82	0,1530
	Infectado	104,47	12,09	0,97	0,8414
GLICINA	Control	105,22	14,26	0,94	0,6880
	Infectado	118,58	36,76	0,81	0,1067
GAD	Control	91,75	10,87	0,89	0,3854
	Infectado	97,24	21,48	0,90	0,4709
VACHT	Control	95,43	26,44	0,90	0,4394
	Infectado	131,40	37,29	0,84	0,1905
ChAT	Control	108,80	22,28	0,76	0,0563
	Infectado	144,46	17,92	0,96	0,7610
MAP2	Control	89,15	10,07	0,79	0,0689
	Infectado	71,05	10,88	0,87	0,3129
NF-H	Control	101,65	18,81	0,88	0,3374
	Infectado	83,58	21,52	0,89	0,3957

W*: Estadístico de Shapiro-Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu (1997)

E. Anexo: Prueba T para observaciones apareadas

InfoStat Permite probar la hipótesis de igualdad de medias cuando se toman observaciones de a pares desde las dos distribuciones que se comparan. Es decir que se dispone de una muestra de tamaño n de pares de observaciones, cada miembro de un par proveniente de una distribución. La *Interpretación*: valores inferiores ($p < 0,05$) evidencia para RECHAZAR el supuesto de igual de las medias. Valores superiores ($p > 0,05$) evidencia para ACEPTAR el supuesto de igual de las medias.

<i>Marcador</i>	<i>N</i>	<i>Media (dif)</i>	<i>Media Control</i>	<i>Media Infectado</i>	<i>DE (dif)</i>	<i>T</i>	<i>P-valor</i>
<i>NeuN densitometría</i>	4	-11,61	136,50	148,10	10,50	-2,21	0,1141
<i>MAP2</i>	5	18,10	89,15	71,05	9,59	4,22	0,0135
<i>NF-200</i>	5	18,07	101,65	83,58	12,65	3,19	0,0331
<i>GABA</i>	4	6,85	111,32	104,47	24,89	0,55	0,6207
<i>Glicina</i>	5	-13,38	105,22	118,60	47,87	-0,63	0,5657
<i>GAD-67</i>	4	-5,50	91,75	97,24	20,31	-0,54	0,6259
<i>VAcHT</i>	5	-36,97	94,43	131,40	21,86	-3,78	0,0194
<i>ChAT</i>	4	-35,67	108,80	144,46	16,67	-4,28	0,0235

F. Anexo: Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

InfoStat permite probar la hipótesis que dos muestras aleatorias independientes, provienen de la misma población, usando el estadístico de Wilcoxon (Lehman, 1975). Esta prueba es equivalente a la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes. Ambas son propuestas no paramétricas basadas en los rangos de las observaciones originales. La *Interpretación*: valores inferiores ($p < 0,05$) evidencia para RECHAZAR el supuesto de igual de las medias. Valores superiores ($p > 0,05$) evidencia para ACEPTAR el supuesto de igual de las medias.

Resultado NeuN Conteo

Marcador	Media control	Media infectado	DE control	DE Infectado	w	P-valor
Lamina VII	42,00	26,25	7,35	2,87	26,00	0,0286
Lamina VIII	52,50	27,25	8,96	4,86	26,00	0,0286
Lamina IX	37,75	19,25	10,05	3,59	26,00	0,0286
Total Asta ventral	132,25	72,75	20,47	2,22	26,00	0,0286

Bibliografía.

1. Banyard A, Horton D, Freuling C, Müller T, Fooks A. Control and prevention of canine rabies: The need for building laboratory-based surveillance capacity. *Antiviral Research*. 2013; 98: 357–64.
2. WHO. WHO Expert Consultation on Rabies 982. Segunda ed. Geneva: WHO Press; 2013.
3. Buitrago D, Roncancio C, Grisales H. Caracterización y perfiles de las exposiciones rábicas en Colombia, 2007-2011. *Biomédica*. 2015; 35:116-7.
4. Jackson A. Therapy of rabies encephalitis. *Biomédica*. 2009; 29: p. Editorial.
5. Abela-Ridder B. Rabies: 100 per cent fatal, 100 per cent preventable. *Vet Rec*. 2015; 177:148-9.
6. Willoughby R, Tieves K, Hoffman G, Ghanayem N, Amlie-Lefond C, Schwabe M, et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med*. 2005; 16: 2508-14.
7. Pathak S, Horton D, Lucas S, Brown D, Quaderi S, Polhill S, et al. Diagnosis, management and post-mortem findings of a human case of rabies imported into the United Kingdom from India: a case report. *Virology*. 2014; 11: 1-7.
8. Zeiler F, Jackson A. Critical appraisal of the Milwaukee Protocol for rabies: This failed approach should be abandoned. *Can J Neurol Sci*. 2016; 43: 44-51.
9. Jackson A. Current and future approaches to the therapy of human rabies. *Antiviral Res*. 2013; 99: 61-7.

10. Yin J, Ding Y, Huang Y, Tao X, Li H, Yu P, et al. Comparative Analysis of the Pathogenic Mechanisms of Street Rabies Virus Strains with Different Virulence Levels. *Biomed Environ Sci*. 2014; 27(10): 749-62.
11. Yousaf M, Qasim M, Zia S, Khan M, Ashfaq U, Khan S. Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. *Virology Journal*. 2012; 9(50): 1-5.
12. Ross A, Favi M, Vásquez A. Glicoproteína del virus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. *Rev.Chil.Infect*. 2008; 25: 14-8.
13. Escobar L, Peterson T, Favi M, Yung V, Medina-Vogeli G. Bat-borne rabies in Latin America. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2015; 57(1): 63-72.
14. Cediell N, Hoz F, Villamil L, Romero J, Diaz A. Epidemiología de la rabia canina en Colombia. *Rev. salud pública*. 2010; 12(3): 368-79.
15. Brito-Hoyos D, Brito E, Villalobos R. Distribución geográfica del riesgo de rabia de origen silvestre y evaluación de los factores asociados con su incidencia en Colombia, 1982–2010. *Rev Panam Salud Publica*. 2013; 33(1): 8–14.
16. Vigilato M, Cosivi O, Clavijo A, Silva H. Rabies Update for Latin America and the Caribbean. *Emerging Infectious Diseases*. 2013; 19: DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1904.121482>.
17. Scheffer K, Iamamoto K, Asano K, Mori E, Estevez Garcia A, Achkar S, et al. Murcielagos hematofagos como reservorios de la rabia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014; 31(2): 302-9.
18. Willoughby R. Resistance to Rabies. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2012; 87(2): 205, Editorial.
19. Wieten R, Leenstra T, van Thiel P, van Vugt M, Stijns C, Goorhuis A, et al. Rabies Vaccinations: Are Abbreviated Intradermal Schedules the Future? BRIEF REPORT. 2013; 56: DOI: 10.1093/cid/cis853.

20. Wohlsein P, Baumgärtner W, Kreipe H, Haverich A, Hori A, Stan A. Rabies transmission through organ transplantation. *Pathologe*. 2011; 32(5): 406-10.
21. Hemachudha T, Ugolini G WS, Sungkarat W, Shuangshoti S, Laothamatas J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2013; 12: 498–513.
22. Jackson A. Rabies pathogenesis update. *Rev Pan-AmazSaude*. 2010; 1: 167-72.
23. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281–97.
24. CDC. CfDCaP. Presumptive abortive human rabies - Texas, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2010; 59: 185-90.
25. Ugolini G. Rabies Virus as a Transneuronal Tracer of Neuronal Connections. In Jackson A, editor. *Advances in virus research - Research advances in rabies*. San Diego: Academic Press; 2011.
26. Velandia-Romero M, Castellanos J, Martínez-Gutiérrez M. In vivo differential susceptibility of sensory neurons to rabies virus infection. *J Neurovirol*. 2013; 19(4): 367-75.
27. Gluska S, Zahavi E, Chein M, Gradus T, Bauer A, Finke S, et al. Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75NTR retrograde Axonal Transport Machinery. *PLOS Pathogens*. 2014; 10: DOI: doi:10.1371/journal.ppat.1004348.
28. Zampieri N, Jessell T, Murray A. Mapping sensory circuits by anterograde trans-synaptic transfer of recombinant rabies virus. *Neuron*. 2014; 81(4): 766–78.
29. Shuangshoti S, Thepa N, Phukpattaranont P, Jittmittraphap A, Intarut N, Tepsumethanon V, et al. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. *BMC Veterinary Research*. 2013; 9(31): DOI: doi:10.1186/1746-6148-9-31.

30. McElhinney L, Marston D, Brookes S, Fooks A. Effects of carcase decomposition on rabies virus infectivity and detection. *Journal of Virological Methods*. 2014; 207: 110-13.
31. Mani R, Madhusudana S. Laboratory Diagnosis of Human Rabies: Recent Advances. *The ScientificWorld Journal*. 2013; 1: DOI: doi.org/10.1155/2013/569712.
32. 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. *Biomedica*. 2010; 30(1): 146-51.
33. Beigh A, Sandhu B, Singh C, Gupta K, Sood N. Comparative evaluation of clinicopathological, immunohistochemical, and immunofluorescent techniques for diagnosis of rabies in animals. *Comp Clin Pathol*. 2015; 24: 1177-84.
34. Sarmiento L, Rodríguez G, De Serna C, Boshell J, Orozco L. Detection of rabies virus antigens in tissue: Immunoenzymatic method. *Patología*. 1993; 37: 7-10.
35. Rossiter J, Jackson A. Pathology. In Jackson A, editor. *Rabies*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 351-86.
36. Kojima D, Park C, Tsujikama S, Kohara K, Hatai H, Oyamada T, et al. 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): 1011–6.
37. Rodríguez G. *Microscopía electrónica de la infección viral*. Primera ed. Bogotá : Instituto Nacional de Salud ; 1983.
38. Torres-Fernandez O, Monroy-Gomez J, Sarmiento L. Unusual ultrastructural findings in dendrites of pyramidal neurons in the cerebral cortex of rabies-infected mice. *PeerJ PrePrints*. 2015;: p. 3:e1047
<https://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.847v1>.

39. Torres-Fernández O, Santamaría G, Rengifo A, Monroy-Gomez J, Hurtado A, Rivera J, et al. Patología dendrítica en rabia: estudio neurohistológico, inmunohistoquímico y ultraestructural en ratones. *Rev. Asoc. Col. Cienc.* 2014; 26: 96-107.
40. Torres-Fernández O, Monroy-Gómez J, Sarmiento L. Ultraestructura dendrítica en neuronas piramidales de ratones inoculados con virus de la rabia. *Revista Biosalud.* 2016; 15:9-16.
41. Jackson A, Randle E, Lawrance G, Rossiter J. Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. *J Neurovirol.* 2008; 14(5): 368-75.
42. Park C, Kondo M, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T, Yoshikawa H, et al. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. *J Vet Med Sci.* 2006; 68(6): 589-95.
43. Suja M, Mahadevan A, Madhusudana S, Shankar S. Role of Apoptosis in Rabies Viral Encephalitis: A Comparative Study in Mice, Canine, and Human Brain with a Review of Literature. *Pathology Research International.* 2011; ID 374286: DOI: doi:10.4061/2011/374286.
44. Jackson A, Zhen F. Pathogenesis. In AC J. Rabies. Tercera ed. San Diego: Academic Press; 2013. 299-349.
45. Fu Z, Jackson A. Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. *J Neurovirol.* 2005; 11(1): 101-6.
46. Torres-Fernández O, Yepes G, Gómez J. Alteraciones de la morfología dendrítica neuronal en la corteza cerebral de ratones. *Biomédica.* 2007; 27: 605-613.
47. Watson C, Kayalioglu G. The Organization of the Spinal Cord. In Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. *The Spinal Cord.* 1st ed. EEUU: Elsevier Ltd; 2009.

48. Kierman J. Barr, El sistema Nervioso Humano. Séptima ed. Mexico: Mc-Graw-Hill Interamericana; 1998.
49. Sengul G, Watson C. Spinal Cord. In Watson C, Paxinos G, Puelles L, editors. The Mouse Nervous System. San Diego: Elsevier Inc.; 2012. p. 424-58.
50. Heise C, Kayalioglu G. Spinal Cord Transmitter substances. In Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. The Spinal Cord. 1st ed. San Diego: Academic Press; 2009.
51. Heise C, Kayalioglu G. Cytoarchitecture of the Spinal Cord. In Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, editors. The Spinal Cord. San Diego: Academic Press; 2009. p. 64-93.
52. Rockhold R. Bases bioquímicas de la comunicación neuronal. In D H. Principios de neurociencia aplicaciones básicas y clínicas. Cuarta ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
53. Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth A. Principles of Neural Science. Quinta ed. EE.UU: MC Graw Hill ; 2013.
54. Olsen R, Li G. GABA. In Brady T, Siegel G, Albers W, Price D, editors. Basic Neurochemistry. 8th ed.: Academic Press; 2012.
55. Hori K, Hoshino M. GABAergic Neuron Specification in the Spinal Cord, the Cerebellum, and the Cochlear Nucleus. Neural Plasticity. 2013; 33(10): 1925–37.
56. Barber R, Vaughn J, Roberts E. The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. Brain Research. 1982; 238: 305-28.
57. Van de Pol A, Gorcs T. Glycine and Glycine Receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. J Neurosci. 1988; 8(2): 472-92.
58. Wu G, Perlmuter S. Sensitivity of spinal neurons to GABA and glycine during voluntary movement in behaving monkeys. J Neurophysiol. 2013; 109: 193-201.

59. Alvarez F, Fyffe R. The continuing case for the Renshaw cell. *J Physiol.* 2007; 584(1): 31-45.
60. Clarke H, Dekaban G, Weaver L. Identification of lamina V and VII interneurons presynaptic to adrenal sympathetic preganglionic neurons in rats using a recombinant herpes simplex virus type 1. *Neuroscience.* 1998; 8(3): 863–72.
61. Kirkpatrick L, Brady B. Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton. In Siegel G, Agranoff B, Albers W, Fisher S, Uhler M, editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th ed. Philadelphia: American Society for Neurochemistry.; 1999.
62. Monteiro M, Kandratavicius L, Pereira P. O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas. *J. epilepsy clin. neurophysiol.* 2011; 17(1): 17-23.
63. Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology.* 2004; 6(204): 1-10.
64. Yuan A, Rao MV, Nixon R. Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science.* 2012; 125: 3257–263.
65. Liua Q, Xieb F, Siedlak S, Nunomurac A, Hondaa K. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2004; 61: 3057–75.
66. Mullen R, Buck C, Smith A. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992; 116(1): 201-11.
67. Wolf HBR, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner P, Pietsch T, Wiestler O, Blümcke I. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem. Cytochem.* 1996; 44(10): 1167-71.
68. Gittins R, Harrison P. Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain Res. Bull.* 2004; 63(2): 155-60.

69. Ünal-Cevik I, Kilinc M, Gürsoy-Özdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Research*. 2004; 1015: 169–74.
70. Gusel'nikova V, Korzhevskiy D. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*. 2015; 7(2): 42-7.
71. Lavezzi A, Corna M, Matturri L. Neuronal nuclear antigen (NeuN): A useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death. *Journal of the Neurological Sciences*. 2013; 329: 45-50.
72. Rengifo A, Umbarila V, Garzón M, Torres-Fernández O. Differential Effect of the Route of Inoculation of Rabies Virus on NeuN Immunoreactivity in the Cerebral Cortex of Mice. *Int. J. Morphol*. 2016; 34: 1362-8.
73. Dumrongphol H, Srikiatkhachorn A, Hemachudha T, Kotchabhakdi N, Govitrapong P. Alteration of muscarinic acetylcholine receptors in rabies viral-infected dog brains. *J Neurol Sci*. 1996; 137: 1-6.
74. Castellanos J, Castañeda D, Velandia A, Hurtado H. Partial inhibition of the in vitro infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neurosci Lett*. 1997; 229: 198-200.
75. Castañeda-Castellanos D, Castellanos J, Hurtado H. Differential use of the nicotinic receptor by rabies virus based upon substrate origin. *J Neurovirol*. 2008; 8: 150-4.
76. Jackson A. Cholinergic system in experimental rabies in. *Acta virol*. 1993; 37: 502-8.
77. Bouzamondo E, Ladogana A, Tsiang H. Alteration of potassium-evoked 5-HT release from virus-infected rat cortical synaptosomes. *Neuroreport*. 1993; 4: 555-8.
78. Ceccaldi P, Fillion M, Ermine A, Tsiang H, Fillion G. Rabies virus selectively alters 5-HT₁ receptor subtypes in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1993; 245: 129-38.

79. Khizhniakova T, Promyslov M, Gorshunova L. The influence of rabies immunization of gamma-aminobutyric acid metabolism in the brains of animals. *Biull Eksp Biol Med.* 1976; 81: 184-5.
80. Ladogana A, Bouzamundo E, Pochiari M, Tsiang H. Modification of tritiated γ -amino-n-butyric acid transport in rabies virus-infected primary cortical cultures. *J of General Virol.* 1994; 75: 623-7.
81. Rengifo A, Torres-Fernández O. Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia. *Biomedica.* 2007; 27: 548-58.
82. Rengifo A. Inmunorreactividad de neuronas gabaérgicas y glutamatergicas en la corteza y el cerebelo de ratones infectados con rabia. Tesis de Maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Neurociencias; 2012.
83. Santamaria G, Rengifo A, Torres-Fernandez O. Expresión de glutamato en la corteza cerebral de ratones normales y ratones infectados con el virus de la rabia. *Revista Científica de UNINCCA.* 2010; 15: 67-81.
84. Torres-Fernández O, Yepes E, Gómez J, Pimienta H. Efecto de la infección por el virus de la rabia sobre la expresión de parvalbúmina, calbindina y calretinina en la corteza cerebral de ratones. *Biomédica.* 2004; 24: 63-79.
85. Torres-Fernández O, Yepes G, Gómez J, Pimienta H. Calbindin distribution in cortical and subcortical brain structures of normal and rabies infected mice. *Int J Neurosci.* 2005; 115: 1372-85.
86. Lamprea N, Torres-Fernandez 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. *Colombia Médica.* 2008; 39: 7-13.
87. Monroy-Gomez J, Torres-Fernandez O. Distribución de calbindina y parvalbúmina y efecto del virus de la rabia sobre su expresión en la médula espinal de ratones. *Biomedica.* 2013; 33: 564-73.

88. Naizaque J, Torres-Fernández O. La inmunoreactividad a calbinina en células de Purkinje del cerebelo de ratones no afectada por la infección con el virus de la rabia. *Biosalud*. 2016; 15: 9-19.
89. Li X, Sarmiento L, Fu Z. Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated, rabies viruses. *J Virol*. 2005; 79(15): 10063-8.
90. Song Y, Hou J, Qiao B, Li Y, Xu Y, Duan M, et al. Street rabies virus causes dendritic injury and F-actin depolymerization in the hippocampus. *J Gen Virol*. 2013; 94: 276–83.
91. Johnson G, Jope R. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J. Neurosci. Res*. 1992; 33(4): 505-12
92. Hurtado A, Rengifo A, Torres-Fernández O. Immunohistochemical overexpression of MAP-2 in the cerebral cortex of rabies-infected mice. *Int J Morphol*. 2015; 33: 465-70.
93. Venugopal A, Ghantasala S, Selvan L, Mahadevan A, Renuse S, Kumar P, et al. Quantitative proteomics for identifying biomarkers for Rabies. *Clin Proteomics*. 2013; 10(1). DOI: doi: 10.1186/1559-0275-10-3.
94. Stepien A, Tripodi M, Arber S. Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells. *Neuron*. 2010; 68(3): 456-72.
95. Juntrakul S, Ruangvejvorachai P, Shuangshoti S, Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Mechanisms of escape phenomenon of spinal cord and brainstem in human rabies. *BMC Infect Dis*. 2005; 16: 104.
96. O'Toole D, Mills K, Ellis J, Welch V, Fillerup M. Poliomyelomalacia and ganglioneuritis in a horse with paralytic rabies. *J Vet Diagn Invest*. 1993; 5(1): 94-7.

97. Kojima D, Park C, Satoh Y, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T. Pathology of the Spinal Cord of C57BL/6J Mice Infected with Rabies Virus (CVS-11 Strain). *J. Vet. Med. Sci.* 2009; 71(3). 319-24.
98. Zhang Y, Zhao S, Rodriguez E, Takatoh J, Han B, Zhou X, et al. Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *J Clin Invest.* 2015; 125: 3782-94.
99. Deng L, Ruan Y, Chen C, Frye C, Xiong W, Jin X, et al. Characterization of dendritic morphology and neurotransmitter phenotype of thoracic descending propriospinal neurons after complete spinal cord transection and GDNF treatment. *Exp Neurol.* 2015; 277:103-14
100. Wang W, Wu S, Li Y. Co-existence of calcium-binding proteins and γ -aminobutyric acid or glycine in neurons of the rat medullary dorsal horn. *Chin Med J.* 2004; 117: 430-3.
101. Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods.* 1998; 79: 1-4.
102. McHanwell S, Watson C. Localization of motoneurons in the spinal cord. In Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G. *The spinal cord.* San Diego : Academic Press; 2009. p. 92-114.
103. Conta A, Stelzner D. The propriospinal system. In Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G. *The spinal cord.* San Diego: Academic Press; 2009. p. 178-90.
104. Ni Y, Nawabi H, Liu X, Yang L, Miyamichi K, Tedeschi A, et al. Characterization of long descending premotor propriospinal neurons in the spinal cord. *J Neurosci.* 2014; 34: 9404-17.
105. Bassuino D, Konradt G, Cruz R, Silva G, Gomes D, Pavarini S, et al. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. *J Vet Diagn Invest.* 2016; 28: 455-60.

106. Dean D, Evans W, McClure R. Pathogenesis of rabies. *Bull World Health Organ.* 1963; 29: 803-11.
107. Baer G, Shanthaveerappa T, Bourne G. Studies on the Pathogenesis of Fixed Rabies Virus in Rats. *Bull World Health Organ.* 1965; 33(6): 783-94.
108. Watson H, Tignor G, Smith A. Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. *J Gen Virol.* 1981; 56: 371-82.
109. Kelly R, Strick P. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J Neurosci Methods.* 2000; 103(1): 63-71.
110. Ugolini G. Use of rabies virus as transneuronal tracer of neuronal connections: Implications for the understanding of rabies pathogenesis. *Dev Biol.* 2008; 131: 493-506.
111. Tsiang H, Lycke E, Ceccaldi P, Ermine A, Hirardot X. The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. *J Gen Virol.* 1989; 70: 2075-85.
112. Coulon P, Derbin C, Kucera P, Lafay F, Prehaud C, Flamand A. Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *J Virol.* 1989; 63(8): 3550-4.
113. Haberl M, Viana da Silva S, Guest J, Ginger M, Ghanem A, Mülle C, et al. An anterograde rabies virus vector for high-resolution large-scale reconstruction of 3D neuron morphology. *Brain Struct Funct.* 2015; 220(3): 1369-79.
114. Tsiang H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. *Adv Virus Res.* 1993; 42: 375-412.
115. Rengifo A, Torres-Fernández O. Cambios en los sistemas de neurotransmisión excitador e inhibitorio en el cerebelo de ratones infectados con virus de la rabia. *Biomédica. Biomedica.* 2013; 33: 80-1.

116. Prosniak M, Hooper D, Dietzschold B, Koprowski H. Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98: 2758-63.
117. Lycke E, Tsiang H. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *J Virol.* 1987; 61: 2733-41.
118. Bauer A, Nolden T, Schröter J, Römer-Oberdörfer A, Gluska S, Perlson E, et al. Anterograde glycoprotein-dependent transport of newly generated rabies virus in dorsal root ganglion neurons. *J Virol.* 2014; 88: 14172-83.
119. Tan G, Preuss M, Williams J, Schnell M. The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 7229-34.
120. Bauer A, Nolden T, Nemitz S, Perlson E, Finke S. A Dynein Light Chain 1 Binding Motif in Rabies Virus Polymerase L Protein Plays a Role in Microtubule Reorganization and Viral Primary Transcription. *Jvirol.* 2015; 88: 9591-600.
121. Asthana J, Kuchibhatla A, Jana S, Ray K, Panda D. Dynein Light Chain 1 (LC8) Association Enhances Microtubule Stability and Promotes Microtubule Bundling. *J Biol Chem.* 2012; 287: 40793-805.
122. Sabo Y, Walsh D, Barry D, Tinaztepe S, de Los Santos K, Goff S, et al. HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 535-46.
123. Kaufmann WE, MacDonald SM, Altamura CR. Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: an immunohistochemical study of the neocortex in Rett syndrome. *Cereb. Cortex.* 2000; 10: 992-1004.
124. Marszalek J, Williamson T, MK L, Xu Z, Hoffman P, Becher M, et al. Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. *J Cell Biol.* 1996; 135: 711-24.

125. Szebenyi G, Smith G, Li P, Brady S. Overexpression of Neurofilament H Disrupts Normal Cell Structure and Function. *J Neurosci Res.* 2002; 68: 185-98.
126. Kong J, Tung V, Aghajanian J, Xu Z. Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons. *J Cell Biol.* 1998; 140: 1167-76.
127. Wong P, Marszalek J, Crawford T, Xu Z, Hsieh S, Griffin JCD. Increasing Neurofilament Subunit NF-M Expression Reduces Axonal NF-H, Inhibits Radial Growth, and Results in Neurofilamentous Accumulation in Motor Neurons. *J Cell Biol.* 1995; 130: 1413–22.
128. Lafon M. Rabies virus receptors. *J Neurovirol.* 2005; 11: 82-7.
129. Coulon P, Bras H, Vinay L. Characterization of last-order premotor interneurons by transneuronal tracing with rabies virus in the neonatal mouse spinal cord. *J Comp Neurol.* 2011; 19: 3470-87.
130. Hendry S, Jones E, Emson P, Lawson D, Heizmann C, Streit P. Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res.* 1989; 76: 467-72.
131. Gotts J, Atkinson L, Yanagawa Y, Deuchars J, Deuchars S. Co-expression of GAD67 and choline acetyltransferase in neurons in the mouse spinal cord: A focus on lamina X. *Brain Res.* 2016; 1646: 570–579.
132. Witts E, Zagoraiou L, Miles G. Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *J Anat.* 2014; 224: 52-60.
133. Sugita S, Fleming L, Wood C, Vaughan S, Gomes M, Camargo W, et al. VACht overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions. *Skelet Muscle.* 2016; 6: 1-17.
134. Prado V, Roy A, Kolisnyk B, Gros R, Prado M. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem J.* 2013; 450: 265-74.

135. Ziskind-Conhaim L. Neuronal correlates of the dominant role of GABAergic transmission in the developing mouse locomotor circuitry. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1279: 43-53.
136. Arber S. Motor Circuits in Action: Specification, Connectivity, and Function. *Neuron.* 2012; 74: 975-89.
137. Kumara S, Buckmaster P. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. *BRAIN RESEARC.* 2007; 1142: 54-60.
138. Lafon M. Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005; 289: 239-58.
139. Guigoni C, Coulon P. Rabies virus is not cytolytic for rat spinal motoneurons in vitro. *J Neurovirol.* 2002; 8: p. 306-17.
140. Rasalingam P, Rossiter J, Jackson A. Recombinant rabies virus vaccine strain SAD-116 inoculated intracerebrally in young mice produces a severe encephalitis with extensive neuronal apoptosis. *Can J Vet Res.* 2005; 69:100-5.
141. Sarmiento L, Li X, Howerth E, Jackson A, Fu Z. Glycoprotein-mediated induction of apoptosis limits the spread of attenuated rabies viruses in the central nervous system of mice. *J Neurovirol.* 2005; 11: 571-81.
142. Rutherford M, Jackson A. Neuronal apoptosis in immunodeficient mice infected with the challenge virus standard strain of rabies virus by intracerebral inoculation. *J Neurovirol.* 2004; 10: 409-13.
143. Zan J, Liu J, Zhou J, Wang H, Mo K, Yan Y, et al. Rabies virus matrix protein induces apoptosis by targeting mitochondria. *Exp Cell Res.* 2016; 347: 83-94.
144. Jackson A. Apoptosis in experimental rabies in bax-deficient mice. *Acta Neuropathol.* 1999; 98: 288-94.
145. Matsumoto S. Electron Microscope Studies Of Rabies Virus In Mouse Brain. *J Cell Biol.* 1963; 19: 565-91.

146. Miyamoto K, Matsumoto S. The nature of the Negri body. *J Cell Biol.* 1965; 27: 677-82.
147. Miyamoto K, Matsumoto S. Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J Exp Med.* 1967; 125: 447-56.
148. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-57.
149. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 124-8.
150. Taatjes D, Sobel B, Budd R. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129: 33-43.
151. Jackson , AC RJ. Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection. *J Virol.* 1997; 71: 5603-7.
152. Chopra J, Banerjee A, Murthy J, Pal S. Paralytic rabies: a clinico-pathological study. *Brain.* 1980; 103: 789-802.
153. Minguetti G, Negrão M, Hayashi Y, de Freitas O. Ultrastructure of peripheral nerves of mice inoculated with rabies virus. *Arq Neuropsiquiatr.* 1979; 37: 105-12.
154. Minguetti G, Hofmeister R, Hayashi Y, Montaña J. Ultrastructure of cranial nerves of rats inoculated with rabies virus. *Arq Neuropsiquiatr.* 1997; 55: 680-6.