



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON VIRUS DEL ZIKA EN LA
ESTRUCTURA Y CITOARQUITECTURA NEURONAL Y
ASTROGLIAL EN ENCÉFALOS DE RATONES.**

Gerardo Santamaría Romero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2020

EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON VIRUS DEL ZIKA EN LA ESTRUCTURA Y CITOARQUITECTURA NEURONAL Y ASTROGLIAL EN ENCÉFALOS DE RATONES

Gerardo Santamaría Romero

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

Magister en Neurociencias

Director:

Biólogo, MSc, Ph.D., Orlando Torres Fernández
Grupo de Morfología Celular
Instituto Nacional de Salud

Codirectora:

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

2020

(Lema)

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica:

La voluntad

Albert Einstein

Agradecimientos

Manifiesto mi agradecimiento a las siguientes personas y entidades:

Al Doctor ORLANDO TORRES FERNÁNDEZ, Coordinador del Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud, director de este trabajo de grado, por todo el apoyo y asesoría permanente; docente desde mi etapa de estudiante de pregrado y la vinculación al Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud (INS).

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

A la compañera AURA CATERINE RENGIFO CASTILLO, Investigadora del Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud, por el apoyo brindado, y quien con su experiencia hizo aportes muy importantes para el desarrollo de este proyecto.

Al compañero JORGE ALONSO RIVERA, Investigador del Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud, por su asesoría en el procesamiento de las imágenes y apoyo en diferentes actividades relacionadas con la investigación.

Al compañero JULIAN NAIZAQUE GOMEZ, Investigador del Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud por sus aportes en el marco de esta investigación.

Al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD por lo que ha significado en mi vida profesional y por brindarme la oportunidad de contribuir con la investigación científica en el país.

A COLCIENCIAS (MINCIENCIAS) por la financiación del proyecto de investigación (código 210474455818) en el que está enmarcado este estudio.

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

Resumen

El Zika es una enfermedad causada por un virus que puede afectar a diferentes órganos, pero cuando ataca al sistema nervioso durante el desarrollo embrionario los efectos son devastadores. Puesto que esta neuropatología es de origen reciente aún se desconocen los mecanismos patogénicos de la infección. Por esta razón, es necesario intensificar la investigación básica de los efectos que produce el Zika en las neuronas y las células gliales, especialmente en la corteza cerebral y el cerebelo. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la infección en la citoarquitectura y la estructura neuronal y astrocitaria, así como en la expresión de marcadores neuronales y astrogliales de la corteza cerebral y el cerebelo de ratones neonatos. Para ello se inocularon ratones de la cepa Balb/c, de 1 día posnatal con virus del Zika por vía intraperitoneal. Una vez los animales alcanzaron un estado avanzado de la infección fueron perfundidos con paraformaldehído (PFA) al 4% para inmunohistoquímica o con solución salina para el método de Golgi-Cox. Para el estudio inmunohistoquímico se extrajeron los encéfalos y se obtuvieron cortes en vibrátomo que fueron procesados con anticuerpos de diferentes marcadores neuronales (NeuN, calbindina, parvalbúmina, calretinina y MAP-2) y astrogliales (GFAP y S-100 β). Para Golgi-Cox se procesaron los encéfalos completos y al final se obtuvieron cortes en vibrátomo. La infección generó efectos diferenciales sobre la inmunorreactividad a los marcadores neuronales. NeuN presentó disminución en todas las capas de la corteza cerebral y en las folias VI, VII y VIII, IX y X del cerebelo. La inmunorreactividad de PV y CR aumentó en la corteza cerebral mientras que disminuyeron las neuronas inmunorreactivas a CB y PV en el cerebelo. La GFAP se incrementó en corteza cerebral y el cerebelo y la S-100 β aumento en la corteza frontal y la capa molecular de la mayoría de las folias excepto la VII y la VIII. Se confirmó que la infección con el virus del Zika genera patología dendrítica asociada a la disminución de la proteína de citoesqueleto MAP-2. En conclusión, la infección con el virus del Zika afecta la citoarquitectura e integridad de las neuronas y los astrocitos en la corteza cerebral y el cerebelo durante los primeros días del desarrollo postnatal.

Palabras clave: Virus Zika, corteza cerebral, cerebelo, neurodesarrollo, NeuN, calbindina, parvalbúmina, calretinina, MAP-2, GFAP, S-100 β , inmunohistoquímica, técnica de Golgi.

Abstract

Zika is a disease caused by a virus that can affect different organs but when it attacks the nervous system during embryonic development, the effects are devastating. Since this neuropathology is of recent origin, the pathogenic mechanisms of the infection are still unknown. For this reason, it is necessary to intensify basic research on the effects that Zika produces on neurons and glial cells, especially in the cerebral cortex and cerebellum. The objective of this work was to determine the effect of infection on the cytoarchitecture and the neuronal and astrocytic structure, as well as on the expression of neuronal and astroglial markers of the cerebral cortex and cerebellum of neonatal mice. For this, mice of the Balb / c strain, 1 day postnatal, were inoculated with Zika virus intraperitoneally. Once the animals reached an advanced stage of infection, they were perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) for immunohistochemistry or with saline solution for the Golgi-Cox method. For the immunohistochemical study, the brains were extracted and vibratome sections were obtained that were processed with antibodies to different neuronal markers (NeuN, calbindin, parvalbumin, calretinin and MAP-2) and astroglials (GFAP and S-100 β). For Golgi-Cox, complete brains were processed and vibratome sections were obtained at the end. The infection generated differential effects on immunoreactivity to neuronal markers. NeuN presented decrease in all layers of the cerebral cortex and in folias VI, VII and VIII, IX and X of the cerebellum. Immunoreactivity of PV and CR increased in the cerebral cortex while neurons immunoreactive to CB and PV decreased in the cerebellum. GFAP increased in the cerebral cortex and cerebellum, and S-100 β increased in the frontal cortex and the molecular layer of most of the folias except VII and VIII. It was confirmed that infection with the Zika virus generates dendritic pathology associated with a decrease in the cytoskeletal protein MAP-2. In conclusion, infection with the Zika virus affects the cytoarchitecture and integrity of neurons and astrocytes in the cerebral cortex and cerebellum during the first days of postnatal development.

Keywords: Zika virus, cerebral cortex, cerebellum, neurodevelopment, NeuN, calbindin, parvalbumin, calretinin, MAP-2, GFAP, S-100 β , immunohistochemistry, Golgi technique.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	13
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1. Virus del Zika	15
1.1.1. Estructura básica	15
1.1.2. Epidemiología	15
1.1.3. Mecanismos de infección del virus del Zika	17
1.1.4. Manifestaciones clínicas	18
1.1.5. Diagnóstico	19
1.1.6. Patología	20
1.2. Corteza cerebral	21
1.2.1. Estructura de la corteza cerebral	22
1.2.2. Desarrollo de la corteza cerebral de ratón	24
1.3. Cerebelo	26
1.3.1. Estructura del cerebelo	26
1.3.2. Desarrollo del cerebelo de ratón	28
1.4. Marcadores Neuronales	29
1.4.1. Proteínas de unión al calcio	29
1.4.2. Proteína nuclear neuronal NeuN	31
1.4.3. Proteínas asociadas a microtúbulos	31
1.4.3.1. Proteína MAP-2	32
1.5. Astrocitos y sus marcadores	33
1.5.1. Proteína S-100 β	33
1.5.2. Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP)	35
1.6. La técnica de Golgi	36
1.7. Técnica inmunohistoquímica	36
1.8. Método de impregnación argéntica de Von Kossa	37
1.9. Antecedentes de esta investigación	38
1.9.1. Estudios morfológicos y citoquímicos en Zika	38
2. OBJETIVOS	41
2.1 General:	41
2.2 Específicos:	41

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1. Manejo de animales e inóculo viral.....	42
3.2. Infección viral, fijación y extracción de los encéfalos.....	42
3.3. Conservación de las muestras y delimitación del área de estudio.....	43
3.4. Estudio Histológico (H&E).....	46
3.4.1. Visualización de calcificaciones (Von Kossa).....	47
3.5. Detección inmunohistoquímica de marcadores.....	47
3.6. Estudio de la morfología dendrítica (Golgi Cox).....	48
3.7. Análisis cualitativo y cuantitativo.	48
3.8. Consideraciones Ambientales.....	50
4. RESULTADOS.	52
4.1 Signos clínicos del Zika en ratones.	52
4.2 Descripción neurohistológica básica.	56
4.2.1 Corteza cerebral.....	56
4.2.2. Cerebelo.....	58
4.2.3. Identificación de calcificaciones.....	60
4.3. Distribución de la inmunorreactividad a NeuN y efecto de la infección con el virus del Zika en la corteza y el cerebelo.....	62
4.4. Expresión y distribución de calbindina y efecto de la infección con Zika	68
4.5. Distribución de la inmunorreactividad a parvoalbúmina y efecto de la infección con el virus del Zika.....	73
4.6. Distribución de la inmunorreactividad a calretinina y efecto de la infección con el virus del Zika.	79
4.7. Distribución de la inmunorreactividad a S-100β y efecto de la infección con el virus Zika.	83
4.8. Distribución de la inmunorreactividad de GFAP y efecto de la infección con el virus Zika.....	.89
4.9. Distribución de la inmunorreactividad a MAP-2 y efecto de la infección con el virus Zika.	94
4.10. Patología dendrítica en neuronas de la corteza cerebral y el cerebelo de ratones infectados con Zika.....	99
5. DISCUSION.....	111
5.1. Modelo animal desarrollado para estudiar la infección por virus Zika.....	111
5.2. Efecto de la infección con virus del Zika en el tejido encefálico de ratón	112
5.3. Efecto de la infección con virus del Zika en la expresión inmunohistoquímica de NeuN	112

5.4. Inmunorreactividad de proteínas de unión a calcio y efecto de la infección por Zika en su expresión tisular	114
5.5. Distribución astrogliar en ratones controles y efecto de la infección con virus del Zika en la expresión de GFAP y S100β.....	118
5.6. Patología dendrítica y expresión de MAP-2 en la infección por virus del Zika en ratones.....	120
Conclusiones.....	121
A. Anexo. Protocolo de bioseguridad para la inoculación y manejo de ratones con el virus del Zika.	122
B. Anexo. Inmunohistoquímica para Zika.....	124
C. Anexo. Inmunohistoquímica para marcadores neuronales.	126

Lista de figuras

Pág.

Figura 3-1. Diagrama de la distribución de las capas de la corteza cerebral frontal de ratón.	44
Figura 3-2. Imágenes de las áreas de estudio en plano coronal del cerebro de ratón.....	45
Figura 3-3. Diagrama de la distribución de las folias del cerebelo de ratón.....	45
Figura 3-4: Imágenes de las áreas de estudio en plano sagital de cerebelo de ratón.....	46
Figura 4-1. Inmunohistoquímica de Zika en la corteza cerebral y el cerebelo de ratón.....	53
Figura 4-2. Valores del peso en gramos, durante diez días post-inoculación, en el grupo de ratones control y en el grupo de animales inoculados con Zika.....	54
Figura 4-3: Signos clínicos en ratones inoculados con el virus del Zika.....	55
Figura 4-4: Coloración H & E en Corteza cerebral de ratón normal e infectado con Zika..	57
Figura 4-5: Coloración H & E en Cerebelo de ratón normal e infectado con Zika.....	59
Figura 4-6. Identificación de calcificaciones en la corteza y el cerebelo de ratones infectados con Zika.....	61
Figura 4-7: Efecto de la infección por virus Zika en la expresión de NeuN de la corteza cerebral de ratón.....	63
Figura 4-8: Efecto de la infección por Zika sobre la expresión de NeuN en el hipocampo	64
Figura 4-9: Efecto del virus sobre la expresión de NeuN en el cerebelo.....	66
Figura 4-10: Inmunohistoquímica para calbindina en cortes coronales de cerebro.....	69
Figura 4-11: Efecto de la infección por virus sobre la expresión de calbindina en el cerebelo.....	70
Figura 4-12: Efecto del con virus Zika en la expresión de parvoalbúmina en la corteza cerebral.....	74
Figura 4-13: Efecto del virus Zika sobre la expresión de parvoalbúmina en el cerebelo...	76
Figura 4-14-: Efecto del virus Zika sobre la expresión de calretinina en la corteza cerebral.....	80
Figura 4-15: Efecto del virus Zika sobre la expresión de calretinina en el cerebelo.....	82
Figura 4-16: Efecto del virus Zika sobre la expresión de S-100B en la corteza cerebral.	84
Figura 4-17: Efecto del virus Zika sobre la expresión de S-100B en el cerebelo.....	86
Figura 4-18: Efecto del virus Zika en la expresión de GFAP en corteza cerebral.....	90
Figura 4-19: Efecto del virus Zika en la expresión de GFAP en el cerebelo de ratón.....	92
Figura 4-20: Efecto de la infección con virus Zika en la expresión de MAP-2 en la corteza cerebral de ratones.....	95
Figura 4-21: Efecto del virus sobre la expresión de MAP-2 en el cerebelo.....	97

Figura 4-22: Tejido procesado por el método Golgi Cox de cerebro de ratones controles e infectados con virus Zika.....	101
Figura 4-23:- Hipocampo de ratones controles e infectados con virus Zika. método de Golgi Cox.....	105
Figura 4-24:- Imágenes de estriado de ratón control e infectado con virus Zika en muestras procesadas por el método Golgi Cox.....	107
Figura 4-25:- Cerebelo de ratón control e infectado con virus Zika. Técnica Golgi Cox...	109

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1. Conteo de neuronas positivas para NeuN en la corteza de ratones de ratones control e infectados con virus Zika	63
Tabla 4-2. Densitometría óptica de la inmunoreactividad a NeuN en el giro dentado de muestras control e infectadas	65
Tabla 4-3. Densitometría óptica de la capa de neuronas piramidales del hipocampo inmunorreactivas a NeuN.	65
Tabla 4-4. Densitometría óptica de células NeuN+ de la capa granular del cerebelo... ..	67
Tabla 4-5. Conteo por folias de neuronas de Purkinje inmunorreactivas a calbindina en el cerebelo.....	71
Tabla 4-6. Densitometría de células de Purkinje inmunorreactivas a calbindina.....	72
Tabla 4-7. Conteo de neuronas inmunorreactivas a parvoalbúmina en la corteza cerebral.....	75
Tabla 4-8. Conteo de neuronas de Purkinje inmunorreactivas a parvoalbúmina en las folias del cerebelo.....	77
Tabla 4-9. Densitometría de neuronas de Purkinje inmunorreactivas a parvoalbúmina... ..	78
Tabla 4-10. Conteo de neuronas inmunorreactivas a calretinina en la corteza frontal.....	81
Tabla 4-11. Conteo de neuronas inmunorreactivas a calretinina en las folias IX y X del cerebelo.....	83
Tabla 4-12. Conteo de neuronas inmunorreactivas a S-100B en la corteza frontal.....	85
Tabla 4-13. Densitometría de S-100B en la capa molecular del cerebelo.....	87
Tabla 4-14. Conteo de células inmunorreactivas a S-100B en la capa granular del cerebelo.....	88
Tabla 4-15. Promedio del Conteo de células inmunorreactivas a GFAP en la corteza cerebral.....	91
Tabla 4-16. Promedios de la densitometría de la capa molecular del cerebelo en muestras procesadas por inmunohistoquímica para GFAP	93

Tabla 4-17. Promedios de la densitometría de la corteza cerebral en muestras procesadas por inmunohistoquímica de MAP-2.....	96
Tabla 4-18. Promedios de la densitometría del cerebelo en muestras procesadas por inmunohistoquímica de MAP-2.....	98
Tabla 4.19. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos neuronales (somas) de neuronas de la corteza cerebral de ratones control e infectados con el virus del Zika procesados por el método Golgi Cox.....	104.
Tabla 4.20. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos neuronales (somas) de neuronas del hipocampo de ratones control e infectados con el virus del Zika.....	106
Tabla 4.21. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos neuronales (somas) de neuronas del estriado de ratones control e infectados con el virus del Zika.....	107.
Tabla 4.22. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos neuronales (somas) de neuronas del cerebelo de ratones control e infectados con el virus del Zika.....	110

Introducción.

Dentro de las infecciones transmitidas por artrópodos, el Zika se ha convertido en una enfermedad epidémica de interés en salud pública. El virus Zika se conoce desde finales de los años 40 (1), los casos de infección humana eran apenas esporádicos y sus efectos relativamente benignos, o imperceptibles (2). A partir del 2007 con la epidemia reportada en la isla Yap en Micronesia, los brotes por Zika en el 2013 y 2014 en la Polinesia Francesa, hasta los casos más recientes en las Américas en la epidemia de los años 2015-2016, surgió como una amenaza para la salud pública cuando se empezó a registrar la asociación entre esta infección viral y el incremento significativo de casos de microcefalia (3) (4) (5) y síndrome de Guillain-Barré (6). Por lo tanto, el Zika se ha convertido en una nueva infección viral de importancia para el sistema nervioso en seres humanos de todas las edades, aunque su mayor interés se ha enfocado en su efecto sobre el neurodesarrollo prenatal y postnatal.

Actualmente es abundante el conocimiento científico acumulado en los últimos años sobre la neurobiología del Zika, no obstante, aún hay mucho por hacer para descifrar los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el carácter neurotrópico de esta infección. Un aspecto importante a tener en cuenta es que la gran mayoría de trabajos publicados en modelos murinos se han realizado utilizando cepas de ratones transgénicos, especialmente de ratones “*knock-out*” para interferón debido a que los ratones inmunocompetentes en su mayoría son resistentes a la infección por Zika debido a la protección que les confiere el interferón (7) (8) (9).

Previamente hemos logrado obtener un modelo de neuroinfección por virus del Zika en ratones inmunocompetentes neonatales gracias al aislamiento de un virus altamente neurotrópico (10) (11). Esto ha facilitado el estudio de la infección por Zika en condiciones experimentales más aproximadas a las de la infección natural. Gran parte de los estudios en los modelos animales se ha centrado en investigar aspectos genéticos y moleculares de la neurobiología del Zika (9), incluyendo los que se han realizado por nuestro grupo (11) (12). Después de diseminarse fuera de África, el virus Zika ha presentado diferentes variantes genotípicas de las cuales han despertado gran preocupación las que presentan tropismo por el sistema nervioso. Debido a que su reaparición y dispersión por el globo terráqueo es muy reciente se tiene escaso conocimiento sobre su biología y hasta hace

poco se le ha asociado con complicaciones neurológicas severas (13). En poco tiempo el Zika pasó de ser apenas una dolencia considerada leve o imperceptible a convertirse en un grave problema de salud pública especialmente en regiones tropicales. Y aunque su principal blanco de ataque ha sido hasta ahora la población infantil en gestación y neonatos existe evidencia de que el virus se ha ido adaptando a fases más avanzadas del desarrollo del sistema nervioso (5) (6) (8). Los estudios de los efectos de la infección sobre la estructura y distribución de las poblaciones celulares (neuronas y glía) son relativamente escasos. Por lo tanto, se requiere profundizar en este tópico para avanzar en el conocimiento del efecto fisiopatológico del virus en el sistema nervioso.

Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo estudiar el tejido nervioso infectado con el virus del Zika en la corteza cerebral y el cerebelo de ratones, mediante el análisis de la inmunorreactividad de marcadores gliales y neuronales. Para cumplir este propósito se realizó el estudio inmunohistoquímico de los marcadores de interneuronas corticales CB, PV, CR, un marcador de neuronas postmitóticas (la proteína NeuN) y la población de células gliales con los marcadores S-100 β y GFAP. También se estudió la patología dendrítica por el método Golgi Cox y evaluando la inmunorreactividad de la MAP-2, una proteína estructural importante para la integridad del citoesqueleto y, por lo tanto, para la estabilidad del árbol dendrítico.

Este trabajo es una contribución al conocimiento del efecto de la infección por Zika en la organización espacial de los componentes celulares del encéfalo. Estos resultados aportan información importante para el entendimiento de los procesos fisiopatológicos del Zika.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Virus del Zika.

1.1.1. Estructura básica.

El virus del Zika pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*, que incluye a otros flavivirus como el virus del dengue, el de la fiebre amarilla o el virus del Nilo occidental (14) (15). La enfermedad por Zika se extiende en la actualidad en América causando una notable preocupación debido al elevado número de casos, países y áreas afectadas, y los problemas neurológicos que ocasiona (5) (6) (16). El Zika presenta una cadena de ARN que contiene 10.794 nucleótidos que codifican 3.419 aminoácidos (17). Su genoma es semejante al de otros flavivirus (5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4-NS4BNS5-3'), codifica las proteínas estructurales C, M y E y también una serie de proteínas no estructurales indispensables para su replicación y ensamblaje (16) (17).

1.1.2. Epidemiología.

El virus del Zika fue aislado por primera vez en 1947 de un macaco *Rhesus* del bosque Zika en Entebbe, Uganda (1). El primate era un animal centinela que presentó fiebre y formaba parte de las investigaciones sobre fiebre amarilla de la fundación Rockefeller. El primer caso sintomático en humano se localizó en Nigeria en 1954 (18). Hasta finales de la década de los sesenta, la seropositividad para el virus del Zika en Kenia era del 50%, pero existían notables diferencias según las áreas geográficas (19). En Nigeria por la década de los setenta el 40% de los sujetos analizados tenía anticuerpos neutralizantes para el virus del Zika y algunos niños con edades entre 1 y 3 años presentaban fiebre, cefalea y malestar general (20) (21).

Durante los siguientes años se detectaron varios casos esporádicos de infección por Zika en diferentes países de África como Uganda, Tanzania, Sierra Leona, República Centroafricana, Egipto, Senegal y Nigeria (22) (23). En otros estudios se detectó el virus en Indonesia, India, Tailandia, Filipinas, Vietnam, evidenciándose un desplazamiento

desde el sudeste asiático hacia el este (24)(23). En estudios realizados entre los años cincuenta y los años ochenta la infección se limitó predominantemente a países de África y Asia (25).

Posteriormente hacia el año 2007 se produjo la primera gran epidemia por virus del Zika en la isla de Yap en Micronesia (26). Se presentó un brote epidémico donde la población presentó fiebre, exantema, dolores articulares y conjuntivitis. Aunque algunos pacientes presentaron inmunoglobulina M positiva para el virus del dengue, muy rápidamente se evidenció que se trataba de ARN de virus del Zika en los sujetos infectados (26).

En el año 2013 se presentó una epidemia en la Polinesia francesa. La cepa causante del brote epidémico se relacionaba filogenéticamente con las cepas que causaron los brotes en el sudeste asiático en el 2010 (27). A partir de ahí el virus se extendió en toda el área del Pacífico (28). Se describieron nuevos casos en las Islas Cook, Nueva Caledonia y luego llegó hasta la isla de Pascua (29) (30). Finalmente ocurrió la gran epidemia de los años 2015 y 2016 en Brasil y países vecinos en América; para comienzos del año 2016 eran más de 2,000 casos confirmados y 118,000 casos sospechosos en América (31) El momento de la propagación del virus a Brasil se desconoce. Y luego se estableció el vínculo entre la infección con el virus y la microcefalia, por todos los casos reportados a raíz de la epidemia de las Américas (3) (4) (5) (6).

Los brotes recientes han tenido un gran efecto en la población, llevando el problema del Zika a ser visto desde un enfoque internacional que ha estimulado la financiación para fomentar la investigación dirigida a perfeccionar el diagnóstico y fomentar la prevención (5), así como para profundizar en el conocimiento de los daños neurológicos, la microcefalia y el síndrome de Guillain Barret, entre otras anomalías congénitas que encienden las alarmas (2) (3) (4) (6). En Colombia, uno de los países más afectados, el Instituto Nacional de Salud (INS) ha liderado la investigación dirigida especialmente a estudiar su impacto en las madres gestantes y la población infantil (32) (33).

1.1.3. Mecanismos de infección del virus del Zika.

El principal vector del virus es un mosquito del género *Aedes*, (*A. aegypti*) que se distribuye en regiones tropicales de todo el planeta y presenta distribución rural y urbana. El virus es epizootico y enzoótico en primates no humanos (34) y se transmite al ser humano por la picadura de mosquitos infectados. El virus Zika ha sido aislado de los mosquitos *A. aegypti*, *A. africanus*, *A. luteocephalus*, *A. apicoargenteus*, *A. vittatus* y *A. furcifer* (35)(1). El *A. polynesiensis* pudo haber favorecido la transmisión del virus en la epidemia de la Polinesia francesa, aunque el *A. hensilli* fue el principal mosquito detectado en la epidemia de las islas Yap en 2007, sin embargo, no se consiguió aislar el virus de esta especie.

En otras investigaciones se ha demostrado que el *A. albopictus* es susceptible de infectarse por el virus del Zika en laboratorio, aunque la cifra de transmisión fue baja (36). Se cree que este arbovirus se adaptó a un ciclo humano aproximadamente hace 5.000 años, cuando las comunidades africanas se hicieron sedentarias y comenzaron a acumular depósitos de agua. Los mosquitos *Aedes* eran principalmente mosquitos arbóreos que se adaptaron a un ciclo doméstico y domiciliario y comenzaron a depositar sus huevos en contenedores humanos (16).

El tiempo de incubación extrínseca del virus en mosquitos es alrededor de 10 días (25) (37). Los mosquitos *A. aegypti*, alcanzan los niveles más altos de virus en los días 20 a 60 después de la infección (37). Para la mayoría de los países tropicales y subtropicales del mundo, las especies, *A. aegypti* y *A. albopictus* representan la mayor amenaza, dada su presencia casi ubicua y su adaptación a los entornos urbanos y peri-domésticos, y sus comportamientos altamente antropofílicos. Han logrado la invasión en algunos países europeos y norteamericanos y su competencia para actuar como vectores con otros numerosos arbovirus (38).

El *A. aegypti*, en particular, es considerado como el vector principal en la transmisión del virus del Zika entre humanos. El Zika también se ha aislado de otros mosquitos de diferente género como *Mansonia uniformis*, *Culex perfuscus* y *Anopheles coustani* (39) Sin embargo es importante tener en cuenta que la capacidad de aislar el virus de ciertas

especies de mosquitos y su competencia in vitro para llevar a cabo la replicación viral no significa que dichas especies sean necesariamente vectores epidemiológicamente importantes (40).

Se ha detectado el virus Zika en saliva en el 19,2% de los individuos infectados pero su importancia epidemiológica no está determinada (41); también se ha documentado la transmisión sexual, el virus ha sido detectado en semen hasta 62 días después del inicio de la enfermedad (42) y se considera que este tipo de transmisión puede tener un papel importante en la ocurrencia de brotes epidemiológicos por Zika (43) (44).

El mecanismo preciso de invasión celular por el virus del Zika es desconocido. Se han descrito posibles receptores que han sido identificados como son las moléculas de adhesión celular de células dendríticas incluyendo las proteínas de choque térmico TIM (TIM-1, TIM-4) y los receptores de tirosina quinasa TAM (Tyro 3, Axl, y Mer) que se expresan tanto en la placenta como también en el cerebro fetal, pero algunos estudios han indicado que hay otros mecanismos dependientes e independientes de receptores que también pueden explicar su neurotropismo y diseminación (45) (46) (47).

1.1.4. Manifestaciones clínicas.

La infección por Zika ha puesto en evidencia un amplio espectro de signos clínicos que van desde la infección asintomática hasta la manifestación de serios problemas neurológicos. Se estima que el 80% de las personas infectadas son asintomáticas y los reportes de casos fatales ocasionados por la enfermedad son escasos (6) (48). Los signos clínicos más comunes asociados a la enfermedad por Zika son fiebre leve, artralgia, dolor de cabeza y retroorbital, erupción maculopapular, desordenes digestivos, conjuntivitis no-purulenta y vértigo (8,9). También se presentan otras manifestaciones como son; leucopenia, trombocitopenia, leves incrementos de enzimas como la *gamma glutamiltransferasa*, signos de inflamación asociados a lactato dehidrogenasa, proteína C reactiva, fibrinógeno y ferritina (49). Los síntomas son evidentes después de un periodo de incubación de 3 a 12 días y pueden persistir de 2 a 7 días (50).

Las formas más graves de la infección por Zika son las complicaciones congénitas tales como la microcefalia (4) y otros problemas neurológicos en estadios prenatales y posnatales (51) (52). También se presentan abortos espontáneos en el primer trimestre o la gestación puede llegar a término, pero los niños pueden presentar déficit cognitivo y disfunción motora (18). En los adultos el problema más importante es el incremento de los casos de Síndrome de Guillain-Barré asociados a la infección con virus del Zika (53) (54)

1.1.5. Diagnóstico.

El diagnóstico de enfermedad por el virus del Zika depende principalmente de los recursos disponibles en el país donde se presenten los casos (55). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) recomiendan realizar pruebas para detectar el virus del Zika en pacientes expuestos y mujeres embarazadas sintomáticas o asintomática ante posible enfermedad congénita (55)

La valoración ante sospecha de enfermedad por virus del Zika se realiza a los individuos que residan o procedan de una zona endémica, que manifieste todos o algunos de los signos clínicos característicos de la enfermedad (5). La infección por Zika puede ser confirmada por medio de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT), como puede ser la localización de ARN del virus por medio de la técnica de PCR-TI en muestras de suero durante los primeros 5-7 días de la enfermedad. Sin embargo, también se deben determinar anticuerpos IgM a través de la técnica de ELISA y una prueba de detección de anticuerpos neutralizantes (prueba de neutralización por reducción en placa) en muestras que deben ser obtenidas después de cuatro días y hasta 14 días siguientes al inicio de la manifestación de signos clínicos (5) (16) (55). Es importante llevar a cabo una prueba de reacción cruzada frente a otros flavivirus, como el virus del dengue, dado que es frecuente la coinfección por ambos virus (16).

Es necesario realizar ecografía prenatal para mujeres embarazadas asintomáticas sin tratamiento continuo. Cualquier paciente sintomática que no esté embarazada debe someterse a una prueba de suero y orina para el virus Zika (55). Se presentan algunos casos en niños o recién nacidos en quienes se complica la extracción de sangre y se hace necesaria la detección del virus del Zika de muestra de saliva (41), aunque puede

presentarse que el ARN puede ser negativo en la saliva y dar un resultado positivo en la muestra de sangre. El ARN viral se detecta en la orina durante un periodo de tiempo mayor que en las muestras de sangre (56). Se han presentado varios casos de virus Zika congénito que son confirmados post-mortem ante sucesos de aborto, desde etapas prenatales, durante el primer trimestre de embarazo, hasta etapas posnatales; en estos casos se soporta el diagnóstico con la presencia de malformaciones. Los hallazgos tanto macroscópicos como histopatológicos hacen parte del diagnóstico diferencial para identificación de daños propios por virus Zika en el desarrollo (57)

1.1.6. Patología.

La infección por Zika genera una serie de alteraciones histopatológicas, sin embargo, cuando la infección se produce de forma tardía en el embarazo, a simple vista el cerebro del bebé en gestación se observa bien formado, pero presenta una moderada calcificación en los núcleos basales (57). La histopatología en autopsias de bebés con lesiones cerebrales graves reporta alteraciones congénitas tales como: patrón de migración celular desordenada en los hemisferios cerebrales, el cerebelo y tronco cerebral, así como lesiones con degeneración de células nerviosas en proceso de apoptosis. También se presentan calcificaciones, lesiones hipoplásicas, disminución o ausencia de fibras descendentes en las estructuras cerebrales, tales como en los núcleos basales, el puente y tracto piramidal (57). Una alteración histológica común es la presencia de procesos inflamatorios. Existe evidencia de que el virus Zika debilita la respuesta inmune innata del huésped, hecho que facilita la propagación del virus (57) (45).

El virus compromete la placenta y por lo tanto promueve el ataque selectivo en las células progenitoras neurales. La disminución de las células madre neuronales está asociada con un crecimiento cerebral restringido y desregulación de los genes implicados en la muerte celular, la proliferación, diferenciación, y migración (58).

El virus Zika puede causar otras anomalías del sistema nervioso central. En ecografías, resonancia magnética o tomografía computarizada de fetos y a través de evaluaciones histopatológicas placentarias y fetales se ha encontrado atrofia parenquimatosa cerebral

con ventriculomegalia, calcificaciones, malformaciones en la corteza cerebral, tales como polimicrogiria y lisencefalia, agenesia, hipoplasia del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelosa y del tronco encefálico, pérdida auditiva neurosensorial, anomalías oculares y artrogriposis; uno de los hallazgos más comunes asociados con la microcefalia fue la reducción del parénquima cerebral supratentorial y el aumento del líquido cefalorraquídeo subaracnoideo. La infección prenatal congénita puede causar anomalías encefálicas severas que se describen como el síndrome de Zika congénito (58).

1.2. Corteza cerebral.

La corteza cerebral es una estructura laminada de muy alta complejidad del sistema nervioso que directa o indirectamente ejerce sus acciones sobre la totalidad del neuroeje. Se encuentra organizada en seis capas, cada una de dichas capas contiene neuronas con propiedades morfológicas y fisiológicas similares. Entre cada una de las capas existen conexiones que permiten la integración y modulación de la información sináptica. La correcta integración y procesamiento de la información es de gran importancia para el desempeño en la ejecución de funciones biológicas de alta complejidad como la generación de movimiento, percepción, memoria o la conciencia, acciones que dependen de una adecuada disposición de las neuronas corticales en columnas funcionales (59).

La organización del neocórtex es el producto de una serie de eventos de proliferación celular y migración de precursores neuronales que se establecen durante diferentes etapas del desarrollo embrionario, conformando la organización de la corteza cerebral (60). Los procesos que se relacionan con la producción y la migración neuronal con referencia a la corteza cerebral de los mamíferos, presentan las mismas características entre las diferentes especies, por esto uno de los modelos animales empleados es el ratón, por la facilidad de su manejo, por lo económico y por ser un modelo experimental muy utilizado para realizar estudios de la corteza cerebral (61).

1.2.1. Estructura de la corteza cerebral.

La corteza cerebral de seis capas de los mamíferos está organizada en áreas anatómica y funcionalmente diferentes (60), conservando un patrón básico uniforme de los tipos celulares que la conforman en aquellos animales que han sido más estudiados como son el ratón, rata, gato y primates incluyendo al hombre (62) (63). La multitud de neuronas que componen la corteza difieren de una capa a otra y de una región a otra, sin embargo, se subdivide en dos grupos funcionales principales: las células piramidales o excitadoras, que utilizan principalmente el aminoácido glutamato como neurotransmisor y las interneuronas o células inhibitorias, que en su mayoría usan el aminoácido modificado γ -ácido aminobutírico (GABA) como neurotransmisor (64).

Las células piramidales son también llamadas células de proyección porque envían su axón fuera de la corteza. Las interneuronas en su mayoría forman proyecciones locales. Estos dos tipos celulares nacen en diferentes regiones del cerebro en desarrollo, pero cada una de las seis capas corticales, con la excepción de la zona marginal, consistirá en una mezcla de ambos tipos de células. La proporción de células piramidales y no piramidales varía ligeramente de una región a otra, pero en promedio, hay cuatro veces más células excitadoras que células inhibitorias en la corteza (65).

De los tipos morfológicos neuronales presentes en la corteza, se destacan las piramidales (66) y los siete tipos bien reconocidos de interneuronas: las células en cesta, células en candelabro, células de doble bouquet, células bipolares (fusiformes), células de Martinotti, células de neurogliformes y las células horizontales de Cajal-Retzius (67) (68). La proporción neuronal es de 70% - 30% si se comparan piramidales con no piramidales (interneuronas o neuronas de axón corto); algunas de estas (las neuronas estrelladas espinosas) son excitatorias (65).

Otra de las características de la neocorteza es la distribución en seis capas; los cuerpos neuronales se segregan en capas con citoarquitectura característica en donde la densidad de los diferentes tipos de somas neuronales varía en cada una de estas capas (64) (66) (67) (68). Al observar cortes coronales de la corteza cerebral teñidos con colorantes básicos, las células se aprecian dispuestas en capas horizontales; cada capa es

caracterizada por poseer ciertos tipos celulares, existiendo variaciones regionales en el número y grosor de las láminas o capas.

La capa molecular I o lámina I se caracteriza por poseer escaso número de células, la mayoría de ellas del tipo horizontal de Cajal y posee una amplia red de fibras especialmente dendríticas apicales de células piramidales y fusiformes con algunos axones de las células de Martinotti. La capa granular externa (lamina II), presenta células estrelladas (nombre con el que se agrupan por su forma a las células en cesta, células en candelabro y las neurogliformes) densamente empacadas y algunas dendritas que ascienden hacia la capa molecular. Sus axones atraviesan las capas más profundas de la corteza sin abandonarla (62) (63) (66) (67) (68).

La capa piramidal externa (lamina III) está conformada principalmente por células piramidales medianas dispuestas en dos subcapas: una superficial de células pequeñas y otra profunda de células medianas. Las dendritas apicales de estas células ascienden hacia la capa molecular y sus axones penetran a la sustancia blanca como fibras de asociación o comisurales; constituyen el estrato eferente más superficial de la corteza cerebral. La capa granular interna (lamina IV) básicamente contiene células estrelladas de axón corto que hacen sinapsis dentro de la misma capa o en zonas vecinas con las dendritas apicales y los somas de las neuronas piramidales. La capa piramidal interna (lamina V) posee células piramidales medianas y grandes cuyas dendritas ascienden hacia la capa molecular y cuyos axones abandonan la corteza como fibras de proyección hacia sitios tan lejanos como el tallo cerebral o la médula espinal (62) (63) (66) (67) (68).

Finalmente, la capa multiforme (lamina VI) contiene un gran número de células de forma variada y está atravesada por gran número de axones que abordan la corteza cerebral o salen de ella como fibras eferentes. Las dendritas de algunas de las células de esta capa ascienden para terminar a nivel medio cortical (lamina IV). Sus axones abandonan la corteza como fibras de proyección hacia el tálamo por esta razón algunos denominan a estas células cortico-talámicas (62) (63) (66) (67) (68).

1.2.2. Desarrollo de la corteza cerebral de ratón.

En ratón la señalización celular que contribuye a la regionalización del sistema nervioso central se presenta entre los días embrionarios E5 – E12; específicamente la corteza cerebral tiene origen y desarrollo entre el día embrionario E12 y posnatal P8 (E12 – P8) y la organización de la corteza cerebral en áreas ocurre entre los días E15-P8 (60). El desarrollo de la corteza cerebral se inicia poco después del cierre del tubo neural y la formación rostral de tres vesículas primarias, a saber, el cerebro anterior (prosencefalo), el cerebro medio (mesencefalo) y el cerebro posterior (rombencefalo). El prosencefalo y el rombencefalo se subdividen en vesículas secundarias, respectivamente: telencefalo y diencefalo; mielencefalo y metencefalo. La corteza cerebral se deriva principalmente de la parte dorsal del telencefalo mientras que el telencefalo ventral da origen a las eminencias ganglionares (65).

En las primeras etapas del neurodesarrollo entre los días E9 – E11, la pared cerebral consiste solo del engrosado neuroepitelio pseudoestratificado. Estas son células neuroepiteliales que corresponden a las células madre de la corteza, donde se presenta una sucesiva y extensa proliferación celular, dando origen a la diversidad de células progenitoras. Esta proliferación ocurre de manera simétrica durante las primeras divisiones y posteriormente de forma asimétrica es decir que las dos células hijas tienen diferentes propiedades celulares y se generan células de la glía radial, el soporte de la migración neuronal radial. El plano de división celular está orientado perpendicular a la zona ventricular (65). La corticogénesis de seis capas en el ratón se desarrolla a partir de las paredes delgadas de las vesículas telencefálicas en el período E10 – E15.5. La división celular tiene lugar principalmente en la zona germinal que rodea al ventrículo lateral, llamado adecuadamente "zona ventricular", desde la cual las células migran a través de la glía radial a su posición final en la corteza (60) (65).

Las neuronas piramidales e interneuronas se generan en diferentes partes de la zona ventricular (VZ). Las neuronas piramidales surgen de la VZ directamente debajo de la pared telencefálica y migran radialmente hacia afuera para formar la corteza, mientras que las interneuronas surgen desde la eminencia ganglionar (futuro estriado o ganglios basales) lateral y medial y migran lateralmente hacia la corteza cerebral (69) (65). Aparte

del sitio de origen, las neuronas corticales eventualmente se posesionan en la corteza de adentro hacia afuera, de manera que las nuevas células se asientan progresivamente en las capas más externas (61). En esta organización, las neuronas piramidales que se originaron más tarde deben migrar más allá que las primeras neuronas que tuvieron origen para llegar a su posición final en la corteza (65).

Los conocimientos actuales sobre los mecanismos celulares y moleculares de señalización que dirigen los procesos de proliferación y migración celular se derivaron de estudios en cultivos celulares y con ratones mutantes (65). Las rutas de migración han sido analizadas mediante técnicas de rastreo de colorantes y marcación retroviral de células clonadas de líneas de ratón de tipo salvaje y mutantes (70). Los procesos de migración celular de interneuronas y células piramidales ocurren simultáneamente y es probable que confluyan entre sí (65) (70).

Se han descrito una variedad de progenitores corticales, dentro de los cuales se encuentran dos poblaciones precursoras neurales en el desarrollo cortical del ratón, que son las células precursoras neurales cortas (SNPs) y las células de glía radial RGCs; estos tipos celulares residen en la zona ventricular y son transcripcionalmente distintas. Las células SNPs, carecen de apego basal y solo están programadas para generar neuronas a través de divisiones simétricas (71). La población de células RGC carecen de apego apical y residen en la parte exterior de la zona subventricular (SVZ); estas células comparten moléculas en común. Las células progenitoras RGC son más importantes en la corteza en desarrollo de mamíferos girencefálicos donde pueden contribuir al plegamiento de la corteza (72). Pese a la diversidad de progenitores corticales, estos presentan características en común y son denominados progenitores apicales (PA) y presentan un pequeño cilio primario que sobresale en el ventrículo lateral de su superficie apical. Dicho cilio primario es sumergido en el líquido cefalorraquídeo y funciona como una antena para sondear señales extracelulares e iniciar transducción intracelular de moléculas de vías específicas (73).

Este cilio también es importante para el mantenimiento de la polaridad ápico-basal de las progenitoras RGCs (74). Se ha reportado la existencia de un cilio primario en las neuronas e interneuronas inmaduras derivadas de la eminencia ganglionar GE (75). La proliferación de los progenitores corticales y la especificación del destino de las células

hijas, estarán determinadas por la integración y transcripción genética, como también por las señales extrínsecas, a través de morfógenos, que no solo tienen impacto en las características intrínsecas de los PA, también tienen una influencia global en la organización y el desarrollo de la corteza cerebral (76).

1.3. Cerebelo.

El cerebelo es una estructura del sistema nervioso central que hace parte del encéfalo y se le atribuyen principalmente funciones motoras como la coordinación, modulación y el inicio de los movimientos. También participa en la regulación del tono muscular, cronología y fuerza de contracción de los músculos junto con el control de la postura y la marcha. Se encuentra ubicado en la fosa posterior y presenta una compleja anatomía que se puede simplificar desde una visión anatomofuncional en tres regiones: La primera es el lóbulo flocculonodular o arquicerebelo que recibe los aferentes vestibulares (vestibulocerebelo), la segunda es el vermis de los lóbulos anterior y posterior o paleocerebelo que, recibe las aferentes de la médula espinal (espinocerebelo) y la tercera la zona media del vermis y los hemisferios cerebelosos o neocerebelo, que reciben información de la corteza cerebral a través de los núcleos del puente (cerebrocerebelo). Está conectado con el tallo cerebral a través de los pedúnculos cerebelosos y tiene estrecha relación con el sistema vestibular y los tractos sensitivos ascendentes desde la médula espinal (77).

1.3.1. Estructura del cerebelo.

El cerebelo está conformado por una corteza o capa superficial de sustancia gris, haciendo parte de pliegues transversos o folias y un centro medular de sustancia blanca con cuatro pares de núcleos centrales (núcleos profundos), denominados: núcleo fastigial, núcleo globoso, núcleo emboliforme y núcleo dentado. Las delgadas folias transversales se encuentran tan plegadas que el 85% de la superficie cortical se encuentra oculta. En los cortes histológicos de cerebelo se ven tres capas corticales organizadas desde la superficie hacia el centro hasta la sustancia blanca de las folias en el siguiente orden:

1- Capa molecular: contiene algunas interneuronas, pero es principalmente una zona sináptica, que contiene las ramificaciones profusas de dendritas de células de Purkinje y los axones de células granulosas; 2- capa de células de Purkinje: una sola fila de cuerpos de células de Purkinje, que corresponden a las células principales de la corteza cerebelosa; y 3- la capa de células granulosas: compuesta por cúmulos compactos de interneuronas de las cuales las más abundantes son las células granulosas (las neuronas más abundantes del sistema nervioso). Los axones de estas pequeñas interneuronas se extienden sobre la capa molecular. Las interneuronas de la capa molecular (células en cesta y células estrelladas) así como las células de Purkinje son gabaérgicas mientras que las células granulares son glutamatérgicas (46) (78).

El cerebelo presenta dos tipos de fibras aferentes a la corteza cerebelosa: 1- las denominadas fibras musgosas que en su mayoría se originan en diferentes núcleos del tallo cerebral y la médula espinal y terminan en contactos sinápticos con células granulosas del estrato más interno y 2- las fibras trepadoras que se originan en el núcleo olivar del bulbo raquídeo, entran a la capa molecular y se enrollan entre las dendritas de las células de Purkinje. Las únicas eferencias de la corteza cerebelosa son los axones de las células de Purkinje que terminan en los núcleos centrales del cerebelo con excepción de algunas fibras de la corteza del lóbulo floculonodular que continúan hacia el tallo cerebral (77) (78)

Una de las características anatómicas del cerebelo de los mamíferos es su intrincado patrón foliar. En el ratón los cromosomas 1, 8, 14 y 19 controlan la variación en el tamaño cerebeloso (79). El patrón foliar característico del cerebelo del ratón se forma durante el desarrollo postnatal (80). La conformación de los patrones morfológicos del cerebelo durante el desarrollo depende de dos procesos generales; diferenciación celular y morfogénesis, ambos procesos responden a la señalización posicional y están involucrados en el desarrollo de las folias del cerebelo (81) (82).

El cerebelo presenta fisuras y surcos que pueden usarse para dividir el cerebelo en una serie de pliegues rostrocaudales denominados lobulillos. Los lobulos cerebelosos se denominan del I hasta el X como se describe a continuación: (I) lobulillo ventral del lobulus centralis, (II) lóbulo dorsal del lobulus centralis, (III) lóbulo ventral del culmen, (IV) lóbulo dorsal del culmen, (V) declive, (VI) tubérculo, (VII) pyramis, (VIII) úvula, (IX) y (X) nodulus.

Esta nomenclatura se utiliza en atlas estándar de ratón, excepto que se usan números arábigos en lugar de números romanos (83) (84) (79). Los diez lóbulos cerebelosos son visibles en una sección sagital media. En este plano, la fisura primaria (prf), fisura secundaria (sf) y fisura preculminada (pcuf) son lo más sobresaliente del cerebelo (79)

1.3.2. Desarrollo del cerebelo de ratón.

La formación del cerebelo en el ratón tiene lugar en a partir del día E9.5, correspondiente al estado de 5 vesículas y posterior al desarrollo de otras estructuras del encéfalo como la corteza cerebral. El cerebelo se desarrolla entre el mesencéfalo y el metencéfalo (65) (61). La organización celular que estructura el cerebelo se inicia por la acción específica de moléculas de señalización celular que tiene lugar y es controlado en el centro organizador llamado *isthmus* (85) El isthmus organizador se forma aproximadamente en el día E7.5 por la expresión de dos factores de transcripción; primero *Otx2* y posteriormente *Gbx2*; durante los próximos 2 días las señales inductivas tempranas establecen el primordio cerebeloso y especifica los linajes celulares (65) (61).

Las células en el primordio cerebeloso se originan a partir de la zona ventricular, una capa de células de glía radial por la cara dorsal del cuarto ventrículo. En esta región se generan células GABAérgicas y gliales. En el día E10.5 se inicia la conformación de las neuronas de los núcleos profundos y simultáneamente se generan células de Purkinje. Entre los días E10.5 a E13.5 las células migran a la superficie pial del cerebelo a lo largo de los procesos de la glía radial (65). En la VZ se generan progenitores gliales de Bergmann y posteriormente el resto de linajes de células GABAérgicas como son las células estrelladas, células en cesta, células de Golgi y de Lugaro (86)

Las interneuronas no se generan directamente de la VZ sino a través de los progenitores que se originaron de la VZ y continúan proliferando en la materia blanca. Dicho proceso se completa hasta día P15. Las neuronas glutamatérgicas se derivan del labio rombalo, que es una estructura transitoria que puede subdividirse en dos dominios, un dominio superior, desde el cual surgen neuronas glutamatérgicas cerebelosas y un dominio inferior que genera células que conformaran núcleos del tallo cerebral (65) (87). Las primeras células glutamatérgicas que se originan son las neuronas de proyección de los núcleos

profundos en los días E10.5 – E12.5, seguido por la producción de los progenitores de células granulares a partir de los días E12.5. Estas células expresan factores de transcripción también expresados en el desarrollo de la corteza cerebral como son Pax6, Tbr1 y Tbr2 (87)

Las células progenitoras generan una capa externa de células granulares que rodea todo el cerebelo por el día E16.5 y estas células proliferan y migran ampliamente conformando la capa granular interna con células ya diferenciadas que se expanden dando lugar a la formación de las folias, entre los días E18.5 al P15; este proceso termina en el día P21 (65) (61). Los primeros conjuntos de axones que llegan al cerebelo son las fibras musgosas y trepadoras en la etapa embrionaria tardía y en la vida postnatal temprana (65).

1.4. Marcadores Neuronales.

Un grupo importante de proteínas han sido utilizadas como marcadores de diferentes tipos de neuronas y células gliales; un marcador ideal debe encontrarse en un solo tipo de célula, en un área determinada del sistema nervioso. Entre los marcadores neuronales más utilizados están tres proteínas de unión al calcio: parvalbúmina (PV) calbindina (CB) y calretinina (CR), la proteína nuclear neuronal (NeuN) y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2).

1.4.1. Proteínas de unión al calcio.

La señalización de calcio intracelular regula muchos aspectos de las respuestas fisiológicas dentro de la célula, como también es importante para la comunicación entre células. Dichos procesos incluyen transcripción, regulación del ciclo celular, diferenciación, motilidad y migración celular, muerte celular programada, contracción y relación entre el músculo esquelético y corazón, así como de la neurotransmisión (88) Para estos procesos relacionados con el calcio se han identificado un grupo de proteínas, históricamente llamadas proteínas de unión al calcio (en inglés abreviado CaBP), que se clasifican como sensores o tampones de Ca²⁺.

El representante prototípico del grupo sensor es la calmodulina (CaM) ubicuamente expresada en todas las células, mientras que los tampones de Ca²⁺ que incluyen PV, CB y CR tienen patrones de expresión muy distinta y a menudo no se solapan (88). Las CaBP presentan una alta solubilidad que les permite estar presentes a través de todo el citosol, aún en dendritas distales y axones, estas características las hacen ideales para estudiar la morfología celular, la conectividad o integración sináptica y la distribución de poblaciones neuronales dentro del sistema nervioso (89).

Las CaBP: CB, PV y CR, hacen parte de la familia EF-Hand, proteínas que tienen en común la capacidad de ligar calcio con alta afinidad y son de gran utilidad en neurociencias por su papel como marcadores neuronales. En diferentes partes del cerebro se han descrito varios tipos de neuronas que se caracterizan por expresar una sola de estas proteínas; en pocos casos se colocan dos de ellas en una misma célula (89) (90) (91). El hallazgo de estas proteínas como marcadores neuronales ha sido un aporte importante para la investigación en neurobiología básica. La hipótesis más aceptada sobre su función es que contribuyen en la regulación de la concentración de calcio (Ca⁺⁺) intracelular para lo cual poseen cadenas laterales hidrofílicas que se unen a iones de calcio (89). En ratas la CB y la CR se expresan tempranamente durante el desarrollo prenatal (E14-E16) del sistema nervioso mientras que la PV lo hace más tardíamente en la primera semana del desarrollo postnatal. El patrón de distribución adulto se alcanza al finalizar la segunda semana postnatal para CR y la tercera semana para CB y PV (91).

Las CaBP son marcadores selectivos de todas las principales interneuronas de la corteza cerebral tanto en roedores como en primates, incluyendo al hombre. La PV se encuentra en células en cesta y células en candelabro; la CB se halla en células bipenachadas o de doble bouquet, en células de Martinotti y en células neurogliformes. La CR se localiza principalmente en células bipolares y en células horizontales de Cajal y en una pequeña población de células de doble bouquet (90) (91). En la corteza del cerebelo la PV se encuentra en las células en cesta, las células estrelladas y las células de Purkinje mientras que la CB es un marcador exclusivo de células de Purkinje; además este es uno de los pocos tipos neuronales que colocaliza CB y PV. La CR se localiza principalmente en las células granulares, así como en las células en cepillo y células de Lugaro (92). La

estabilidad y distribución intracelular de estas proteínas facilita el estudio inmunohistoquímico de la distribución de las poblaciones neuronales en condiciones normales y patológicas (89) (90).

1.4.2. Proteína nuclear neuronal NeuN.

La proteína nuclear neuronal (NeuN) fue identificada inicialmente en el sistema nervioso de ratones y otros vertebrados a comienzos de los años noventa, a través de estudios inmunológicos y de biología molecular (93). La NeuN ha sido considerada como un marcador de gran importancia porque se localiza exclusivamente en neuronas y de forma característica en los núcleos, aunque se difunde por todo el citoplasma neuronal. Se cree que tiene funciones reguladoras de los mecanismos de síntesis de proteínas y ha sido utilizado para analizar tamaño y forma de las neuronas así como también para establecer la densidad neuronal por medio de conteos (94) (95).

NeuN es un marcador neuronal muy utilizado para el estudio histopatológico de enfermedades del sistema nervioso y para la investigación sobre el desarrollo embrionario, la neurogénesis adulta y los estudios de pérdida neuronal en condiciones naturales y experimentales (94) (96) (97) (95). La proteína NeuN es un marcador exclusivo de neuronas posmitóticas (98) y es de gran utilidad para describir la distribución estratificada de los cuerpos de las neuronas, característica que hace de esta proteína un excelente marcador para el estudio inmunohistoquímico de la citoarquitectura neuronal en enfermedades neurológicas que inducen cambios citomorfológicos (95).

1.4.3. Proteínas asociadas a microtúbulos.

El citoesqueleto permite que las células mantengan su forma y organización interna, y son un soporte mecánico para llevar a cabo funciones esenciales como la división y el movimiento. Está compuesto por tres complejos estructurales: microtúbulos (MTs), neurofilamentos (NFS) y microfilamentos (MFS), cada uno tiene una composición característica, estructura y organización especializada (99) (100). Los microtúbulos están compuestos por ensamblajes de dímeros de α y β tubulina que están unidos a proteínas

específicas, dichas proteínas son las MAPs (proteínas asociadas a los microtúbulos). La unión diferencial de los microtúbulos con estas proteínas permite una gran variedad en la modulación funcional de los componentes del citoesqueleto en el entorno celular (100).

Las MAPs se pueden dividir en tres familias distintas: MAP1, MAP2 y tau. La familia MAP1 tiene tres isoformas presentes en la mayoría de los vertebrados, los miembros de la familia MAP1 son codificados por diferentes genes, su función es la de regular y estabilizar la formación de microtúbulos (100). La proteína Tau por su parte participa en el ciclo de asociación-disociación de los microtúbulos confiriendo dinamismo a los mismos, se encuentra localizada en el citoplasma (101).

1.4.3.1. Proteína MAP-2.

En la familia MAP2 las isoformas se dividen en las de alto peso molecular (MAP2A; MAP2B) que expresan exclusivamente en las neuronas; su expresión se limita al cuerpo celular y las dendritas, pero no se encuentran en los axones. Las MAP2 de bajo peso molecular (MAP2C, MAP2D) están presente en neuronas y células gliales distribuyéndose en todos los compartimentos neuronales (100) (102). Dentro de las funciones de las MAP2 se encuentran: la estabilización de los microtúbulos, la inhibición de la polimerización, el aumento de la rigidez de los microtúbulos y la modulación de la iniciación de las neuritas, además de participar en la formación de entrecruzamientos entre los microtúbulos y los neurofilamentos (102).

Los anticuerpos anti-MAP2 usados para inmunohistoquímica en tejido nervioso permiten hacer la demarcación de las dendritas apicales de las neuronas piramidales en la corteza cerebral (103) y de la arborización dendrítica en células de Purkinje (104). Eventualmente pueden también hacerse visibles en el soma neuronal (103).

1.5. Astrocitos y sus marcadores.

Existen tres grupos bien caracterizados de células gliales en el SCN: astrocitos, oligodendrocitos y células de la microglía. Los astrocitos son los más numerosos y tienen diferentes funciones metabólicas. Los oligodendrocitos son las células encargadas de formar la mielina alrededor de los axones y la microglía corresponde a células de origen mesodérmico del tipo macrófagos que se quedan inmersas dentro del tejido nervioso durante el neurodesarrollo (77). La población de astrocitos es 10 veces mayor que la población neuronal (105). Son importantes como soporte del tejido nervioso, participan en funciones metabólicas y nutricionales, en los ciclos de neurotransmisión y forman parte de la barrera hematoencefálica. Las infecciones nerviosas generan reacción de los astrocitos que se manifiesta con aumento de la cantidad y tamaño de estas células gliales (105) (106) (107). Además, existe evidencia de que el virus del Zika ingresa al sistema nervioso a través del componente astrocitario de la barrera hematoencefálica (108). La proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y la proteína de unión a calcio S100 β son los marcadores de astrocitos más utilizados (106) (107) (109). Recientemente en nuestro grupo de investigación se llevó a cabo un trabajo en ratones adultos donde se observó diferente distribución y reacción de cada uno de ellos en la corteza cerebral, en condiciones normales y patológicas, utilizando el virus de la rabia (110).

1.5.1. Proteína S-100 β .

La proteína de unión a calcio S100 es una fracción que dispone principalmente de dos polipéptidos, S100A1 y S100B. La S100 se expresa en diversos tipos celulares, el nivel de expresión de estos dos dímeros es mayor en el sistema nervioso (111). La S-100 son proteínas pequeñas y ácidas de un tamaño de 21 KDa que traducen las señales de Ca²⁺. Funcionan como receptores de Ca²⁺ que de acuerdo con sus niveles intracelulares generan cambios en la función celular (112).

La molécula se encuentra de forma extracelular e intracelular como proteína sensor del calcio, puede regular los procesos por medio de distintos mecanismos; tienen isoformas específicas que modulan la S100 y pueden actuar de manera inhibitoria o excitatoria

(111). La proteína S100 está implicada en la modulación de diversos procesos intracelulares y extracelulares incluyendo la comunicación célula-célula, estructura celular, metabolismo energético, regulación de la división celular, diferenciación, movilidad, crecimiento celular, contracción y transducción de señales, transcripción, inhibición de la fosforilación, entre otras (111) (112). La S100 juega un papel importante en la coordinación de la dinámica de los elementos principales del citoesqueleto que constituyen la morfología celular; como son los microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios.

Las proteínas S100 hacen parte de una familia multigénica, que comprende 25 miembros que tienen similitud en sus características estructurales y comparten el 50% de homología de secuencia de aminoácidos y se expresan diferencialmente en diferentes tipos celulares (111). Este trabajo se enfocó en un solo tipo, la proteína S100B (homodímero de la subunidad β). Constituye el 0.2% del total de proteínas del sistema nervioso y está presente en la membrana del aparato de Golgi, membrana perinuclear y membrana plasmática sináptica, presenta una alta afinidad por los lípidos y puede generar cambios en las propiedades estructurales de la bicapa lipídica. La S100 β tiene funciones extracelulares e intracelulares (113). Una de sus principales funciones es regular el ensamblaje de los filamentos intermedios tipo III y los microfilamentos (111).

La S100 β se encuentra en células que presentan activación del Ca²⁺, como es el caso de los astrocitos (111) (112) (114). Entre sus principales funciones se encuentra; promover la extensión de neuritas, proteger del daño oxidativo causado por iones de cobre, presenta actividad neurotrófica y mitogénica, modula la fosforilación y degradación, ejerce un efecto autocrino en los astrocitos, promueve la proliferación de células gliales y que se incremente el Ca²⁺ en estas y en las neuronas, lo que desencadena muerte celular (111) (114). S100 β tiene que ver con la nucleación de los microtúbulos y estimula proteína quinasa nuclear que ayuda a la regulación de la morfología y ciclo celular (114). La inhibición de S100 β podría afectar la proliferación de células gliales. La proteína S-100 β se encuentra en el sistema nervioso en oligodendrocitos, células de Schwann y es considerado un marcador específico de astrocitos, que corresponde a las células que principalmente sintetizan y expresan la proteína (111).

1.5.2. Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP).

La GFAP es una de las proteínas fibrosas que conforman los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células gliales. Dentro de sus principales funciones esta la protección de la rígida organización de la estructura tridimensional interna de los astrocitos del cerebro, manteniendo la flexibilidad y curvatura. En ciertas células se encuentra estrechamente relacionada con filamentos de vimentina, desmina y periferina, los cuales están implicados en la estructura y función del citoesqueleto (115).

La proteína GFAP es una subunidad molecular que constituye uno de los cinco tipos de filamentos intermedios (IFs), junto con vimentina, nestina y sinemina, que tienen gran parecido en la homología de las secuencias de los genes que los conforman. Los filamentos de la GFAP pueden migrar desde la zona perinuclear, hasta que convergen en los procesos celulares (116). La GFAP en conjunto con los microfilamentos y microtúbulos, constituyen la estructura y función proteica relacionada con la estabilidad del citoesqueleto y la comunicación entre células. Otras de sus funciones es su participación en el mantenimiento de la arquitectura cerebral, el adecuado funcionamiento de la BHE, la migración de los astrocitos, en las interacciones entre la glía y las neuronas y en las diferentes vías de transducción de señales. La GFAP es un marcador de astrocitos y es la base molecular de su morfología básica (105) (106) (115).

La inmunorreactividad a GFAP en el encéfalo también varía de acuerdo con la edad y localización (117). La GFAP en el SNC se localiza en astrocitos fibrosos en la sustancia blanca, astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris, en la glía de Bergmann (cerebelo) y en los astrocitos subependimales del ventrículo lateral (115). También se ha encontrado inmunorreactividad a la GFAP en otras células no astrocíticas, como las células de Schwann o células de Kupffer (115). La síntesis de GFAP se considera un evento muy importante en el desarrollo y la diferenciación de astrocitos. La GFAP es parte de la respuesta reactiva a casi cualquier lesión del SNC. En condiciones normales la expresión de la proteína GFAP se encuentra en niveles bajos. Pero su expresión aumenta cuando se presenta una lesión o un daño del SNC. La cooperación de GFAP y la vimentina son indispensables en la formación de cicatriz glial luego de alguna lesión en el encéfalo (106) (115) (118) (116)

1.6. La técnica de Golgi.

La técnica de Golgi ha sido una herramienta de amplio uso en el estudio de la neurohistología básica (119) (120) (121) (122) (123) (124). Su descubrimiento lo hizo Camillo Golgi en 1873 y luego Santiago Ramón y Cajal fue su principal exponente; los dos investigadores recibieron el premio nobel de Medicina y Fisiología en 1906 por su contribución al conocimiento de la estructura del sistema nervioso (122). El método de Golgi continúa siendo el procedimiento que mejor revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones. Aunque existen métodos modernos de tinción intracelular que revelan imágenes excelentes de la morfología neuronal, la técnica de Golgi se mantiene vigente por ser un método más práctico y menos costoso para el estudio de la morfología normal y patológica de las neuronas (122) (125).

Se han estandarizado diferentes metodologías de la técnica de Golgi, una de estas es el método Golgi Cox, que en su versión más moderna (126), permite el procesamiento de encéfalos completos de ratones y ratas e impregna un mayor número de neuronas y se considera un método muy confiable para demostrar la arborización dendrítica. Se han llevado a cabo modificaciones adicionales de este método buscando aumentar su fiabilidad (123). Para finalizar esta sección es importante anotar que se ha establecido asociación entre la patología dendrítica descrita con la técnica de Golgi y alteraciones en la expresión inmunohistoquímica de MAP2 (127) (125) (128) (129) (103).

1.7. Técnica inmunohistoquímica.

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) ha sido una herramienta invaluable para la detección, localización y cuantificación de antígenos en un tejido preservado para investigación y diagnóstico (130). En diferentes desordenes neurodegenerativos del sistema nervioso la IHQ se incluye en el estudio de un amplio rango de enfermedades caracterizadas por la disfunción y muerte de poblaciones específicas y selectivas de células nerviosas.

Las IHQ permite la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y función celular. La

aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares facilita la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio. Un aspecto elemental, pero esencial, es la preservación del tejido desde el momento de su obtención. La inmensa mayoría de técnicas inmunohistoquímicas pueden aplicarse a tejido fijado con formaldehído con buenos resultados, siempre que la fijación tisular, su procesamiento e inclusión se realicen correctamente. (131) (132).

Las aplicaciones derivadas de las técnicas inmunocitoquímicas pueden ser muy numerosas si se dispone del anticuerpo adecuado o de la tecnología que se precisa para obtenerlos. La aplicación de la inmunocitoquímica ha permitido ir más allá de la mera estructura haciendo posible el avance en el conocimiento de la localización y caracterización química de poblaciones neuronales y de participación en circuitos cerebrales (133). La posibilidad de generar anticuerpos contra las proteínas codificadas por genes conocidos como los de tipo *homeobox* ha permitido estudiar el patrón de expresión espaciotemporal de dichos genes en el sistema nervioso embrionario o para identificar a los genes que intervienen en el control de la muerte y supervivencia neuronal. El fundamento racional de la inmunocitoquímica aplicada a la neurobiología es básicamente el mismo desde que fue introducido por Coons y Kaplan en los años cincuenta (132).

1.8. Método de impregnación argéntica de Von Kossa.

El método de impregnación argéntica de Von Kossa para depósitos de sales de calcio (sulfatos o carbonatos), es una técnica convencional para la identificación y tinción de pigmentos y iones metálicos. Existen muchas modificaciones de la técnica clásica de Von Kossa para la determinación de calcio. En general todas se basan en un proceso análogo al de la fotografía en blanco y negro, en la cual se realiza la sustitución de iones cálcicos intratisulares en forma de fosfatos o carbonatos, por iones de plata en solución acuosa sometidos a un proceso simultáneo de exposición a la luz solar. La exposición a la luz solar se puede sustituir por una incubación con la solución de plata en la oscuridad, para realizar después una reducción externa con agentes químicos, de tal forma que se deposita la plata metálica sobre los núcleos de precipitación donde los iones argénticos han sustituido el calcio. De esa forma los depósitos de calcio se colorean de negro. Este es un método muy sensible para la determinación de microcalcificaciones (131).

1.9. Antecedentes de esta investigación.

1.9.1. Estudios morfológicos y citoquímicos en Zika.

La enfermedad por Zika genera alteraciones histopatológicas que han sido estudiadas en autopsias de bebés con lesiones cerebrales graves. Se han reportado daños congénitos caracterizados por cambios en la morfología tales como: patrón de migración celular desordenada en los hemisferios cerebrales, el cerebelo y tronco cerebral, así como lesiones con degeneración de células nerviosas en proceso de apoptosis. Otro rasgo característico es la presencia de calcificaciones (57). Se presentan lesiones hipoplásicas, disminución o ausencia de fibras descendentes en las estructuras cerebrales, como en los núcleos basales, el puente y tracto piramidal (57) (33). Una característica histológica común es la presencia de procesos inflamatorios. Existe evidencia de que el virus Zika debilita la respuesta inmune innata del huésped, hecho que facilita su propagación (57) (45).

El virus se ha identificado en placenta y por lo tanto promueve el ataque selectivo en las células progenitoras neurales. La disminución de las células madre neurales está asociada con un crecimiento cerebral restringido y desregulación de los genes implicados en la muerte celular, la proliferación, diferenciación y migración (134) (52). El virus Zika puede causar otras anomalías del sistema nervioso central. En ecografías, resonancia magnética o tomografía computarizada de fetos y a través de evaluaciones histopatológicas placentarias y fetales se ha encontrado atrofia parenquimatosa cerebral con ventriculomegalia, calcificaciones, malformaciones en la corteza cerebral, tales como polimicrogiria y lisencefalia, agenesia, hipoplasia del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelosa y del tronco encefálico, pérdida auditiva neurosensorial, anomalías oculares y artrogriposis; uno de los hallazgos más comunes asociados con la microcefalia fue la reducción del parénquima cerebral supratentorial y el aumento del líquido cefalorraquídeo subaracnoideo (134) (45) (52). La infección prenatal congénita puede causar anomalías encefálicas severas que se describen como el síndrome de Zika congénito (52) (58).

Se han realizado diferentes estudios en modelos animales, logrando signos de la infección que se asemejan a los signos clínicos reportados en humanos en humanos. Las

investigaciones han dado resultado con ratones inmunosuprimidos (9). La infección por Zika genera muerte neuronal por apoptosis, liberación del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-1b (IL-1b) y glutamato, pueden ser neurotóxicos (135). La enfermedad ocurre durante etapas embrionarias prenatal y posnatal en ratones (10) (9). El virus ingresa al sistema nervioso central inicialmente dirigido a los astrocitos en todo el cerebro y, posteriormente, a las neuronas (108).

Se ha demostrado que el virus induce muerte de células madre neuronales del hipocampo de ratones adultos (136). La infección neonatal puede perturbar el normal desarrollo del hipocampo, que es la estructura cerebral involucrada en el aprendizaje y memoria, alberga poblaciones neuronales en diferentes estados de maduración, aunque se ha encontrado en ratones inmunocompetentes, la infección no afecta el desarrollo del hipocampo en ratones, pero sí induce daño y muerte neuronal independientemente de su estado de maduración (137). En el hipocampo se detectó la presencia del virus con inmunofluorescencia y microscopia electrónica. Se encontró el virus en todas las neuronas del hipocampo; neuronas piramidales que maduran durante la fase embrionaria, en el giro dentado, en las células Cajal-Retzius que pertenecen a las primeras neuronas corticales nacidas, en células granulares que se generan predominantemente en la etapa postnatal (137). En tejido infectado con Zika se identificó reacción de astrocitos por daño tisular y respuesta de la microglía. Dependiendo de la carga viral y el tiempo de incubación, se ha observado pérdida neuronal generalizada en cultivo de rodajas de hipocampo (137).

En estudios de nuestro grupo de investigación se encontraron cambios en la expresión de genes asociados al neurodesarrollo en ratones neonatos infectados con virus Zika: subregulación de *Clcn2*, *Reln*, *Calb 1*, *DCX*, *PVALB*, *Map-2* y *NeuN* y sobreexpresión de *GFAP* (138). También se hallaron alteraciones en la expresión de genes asociados al neurodesarrollo en el cerebelo de ratones infectados con el virus del Zika; subregulación de *CLCN2*, *CDH20*, *Cep*, *Calb*, *DCX*, *PVALB*, *Map-2*, *NeuN* y sobre expresión de *GFAP* (139). Este trabajo se enmarca en Línea de Investigación "Vulnerabilidad selectiva neuronal" del Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud respaldado por una trayectoria en trabajos de neurovirología similares a los de esta investigación (ver referencias (140) (125) (128) (103) (110) (95) (68) (103) (129) (122) (141) (142) (143), desarrollados en ratón como modelo animal y el virus de la rabia como patógeno.

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto “Estudio del efecto de la infección por virus Zika sobre la citomorfología, la neurobioquímica y el neurodesarrollo en modelos in vivo e in vitro”. Financiado por Colciencias y el INS (Código 210474455818), Contrato 672/2017. De este proyecto se han adelantado resultados importantes pero en temas diferentes a los de esta propuesta (144), (10) (11) (145) (146) (12).

2. OBJETIVOS

2.1 General:

Estudiar el efecto de la infección con el virus del Zika en la estructura y distribución de las poblaciones neuronales y los astrocitos (citoarquitectura) así como en la expresión de marcadores neuronales y astrocitarios de la corteza cerebral y el cerebelo de ratones neonatos.

2.2 Específicos:

- Evaluar los efectos de la infección con el virus del Zika en la citoarquitectura* neuronal y astrocitaria.
- Describir y cuantificar el efecto de la infección por Zika en la expresión inmunohistoquímica de marcadores neuronales y astrocitarios de ratones neonatos.
- Observar y describir el efecto de la infección por Zika en la citomorfología y estructura neuronal.

*El término citoarquitectura se utiliza para describir la distribución de las poblaciones celulares dentro de un órgano determinado. En el tejido nervioso se ha utilizado especialmente para estudiar la distribución neuronal en estructuras estratificadas tales como la corteza cerebral pero igual se puede aplicar para la corteza del cerebelo y para la distribución de células gliales. La citoarquitectura neuronal y glial puede ser alterada en eventos patológicos como los generados por infecciones virales.

3. Materiales y métodos.

3.1. Manejo de animales e inóculo viral.

El material biológico utilizado (encéfalos) correspondió a ratones hembra o machos de la cepa Balb/C de 1 día postnatal con un peso promedio de 1,3 gramos. La selección de los animales para la conformación de los grupos se realizó de acuerdo con el número de crías por camada (para esta cepa oscilaron entre 3 y 10 crías). Los ratones estuvieron confinados en una sala de alta seguridad del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), en condiciones ambientales y nutricionales, de acuerdo con las 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 del INS y del comité de ética de la Facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Esta investigación se realizó siguiendo el “Protocolo para el uso de animales de laboratorio” establecidos por el INS. Para la inoculación se utilizaron alícuotas de virus del Zika aislado previamente como parte del proyecto de investigación en Zika, con un título viral de $9,4 \times 10^6$ PFU/ml reproducido a partir de cultivo de células Vero (11). Con este virus se ha demostrado experimentalmente su carácter altamente neurotrópico (10) (11).

3.2. Infección viral, fijación y extracción de los encéfalos.

Para evaluar los efectos de la infección con el virus del Zika en la citoarquitectura neuronal y astrocitaria y describir y cuantificar el efecto de la infección por Zika en la expresión inmunohistoquímica de marcadores neuronales y astrocitarios de ratones neonatos (objetivo 1 y 2) se inocularon 10 animales (ratones neonatos de un día de nacidos) por vía intraperitoneal con 0.03 ml de virus Zika y sus respectivos controles (10 animales) inoculados con la solución diluyente, sin el virus. Los animales se mantuvieron en observación durante los días siguientes, se tomó nota del peso y los cambios clínicos y comportamentales hasta el momento en que los animales alcanzaron una etapa avanzada de la enfermedad (Ver anexo **A**).

El día 10 p.i. (once días de edad), los ratones fueron anestesiados con 0,05ml de hidrato cloral (Merck) al 30%, inoculado por vía intraperitoneal. Luego se llevó a cabo la fijación de los tejidos mediante perfusión intracardiaca para lo cual se dejó circular inicialmente tampón de fosfato salino (PBS) a pH 7,3, durante 3 minutos y luego 40 ml de una solución de fijado (paraformaldehído (PFA) al 4%). Después de completar la perfusión con el fijador nuevamente se dejó correr PBS por 1 minuto, se procedió inmediatamente a la extracción del encéfalo y este se dejó en la misma solución de fijación a 4° C, por pocos días, hasta llevar a cabo el procedimiento inmunohistoquímico.

Con el fin de observar y describir el efecto de la infección por Zika en la citomorfología y ultraestructura neuronal (objetivo 3) se trabajó con un grupo de cinco ratones neonatos de un día de nacidos que fueron inoculados por vía intraperitoneal con 0.03 ml de virus Zika y sus respectivos controles inoculados con solución diluyente desprovista de virus. A los 10 días p.i. los ratones inoculados con Zika y sus controles, luego de ser anestesiados, fueron perfundidos con solución salina (NaCl al 0.9%) durante tres minutos, se extrajeron los encéfalos e inmediatamente fueron sumergidos en PFA al 4% durante una hora y luego procesados mediante la técnica de Golgi-Cox.

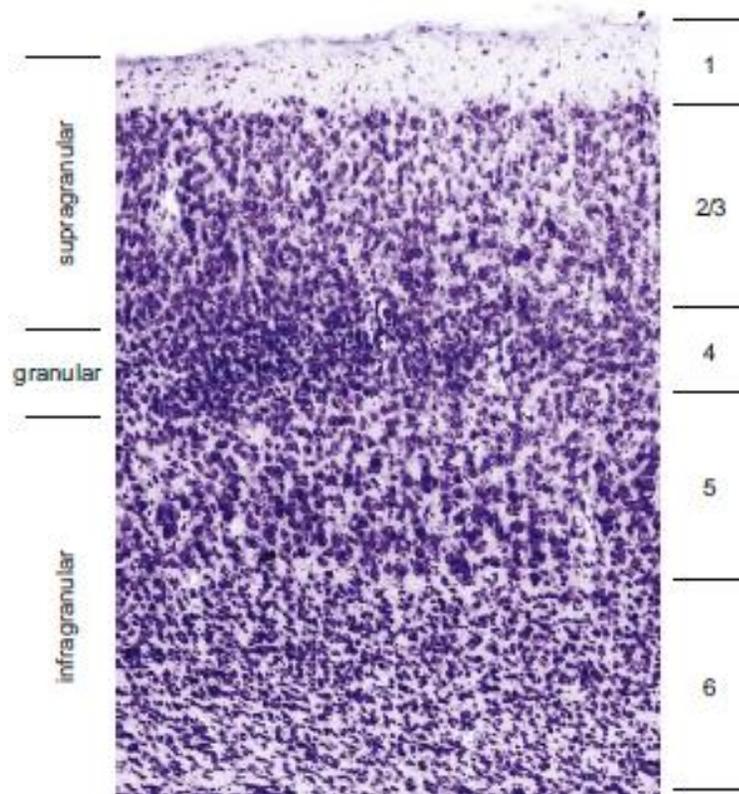
3.3. Conservación de las muestras y delimitación del área de estudio.

Una vez se realizó la fijación de los encéfalos mediante 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 4%. Las muestras que fueron perfundidas con solución salina inmediatamente se transfirieron a PFA 4% y luego se incluyeron en la solución Cox (ver detalles más adelante, sección 3.6). Todas las muestras fueron almacenadas en una nevera a 4°C (Celsius) y fueron procesadas máximo dos semanas después de la fijación.

Para separar el cerebro del cerebelo se realizó un corte con una cuchilla en la parte más caudal de los hemisferios cerebrales donde conectan los pedúnculos cerebelares, aislando el tallo cerebral unido al cerebelo. Las áreas de estudio comprendieron la corteza cerebral frontal (FR) (*Figura 3-1*) según el atlas de Valverde (147), a nivel del fornix y la

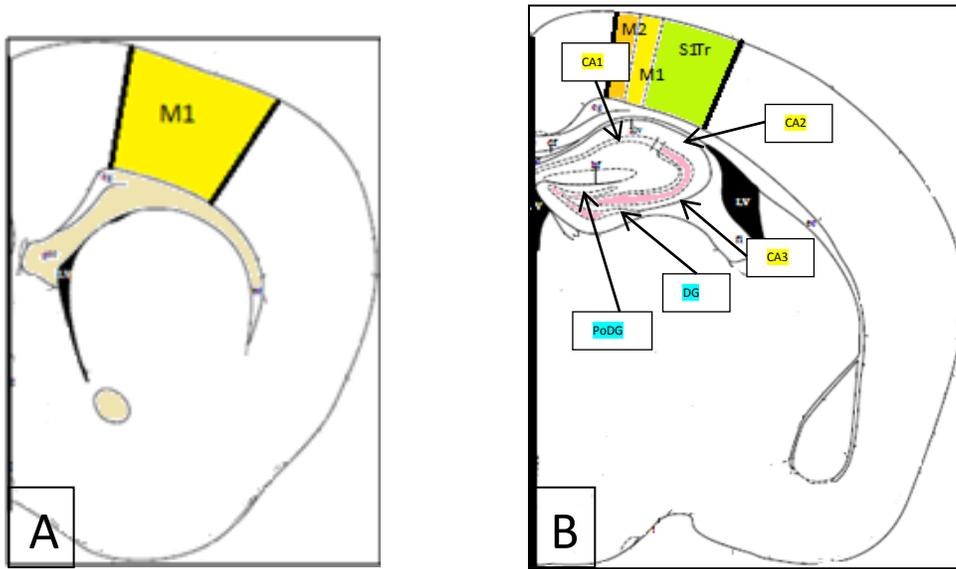
decusación de la comisura anterior, hasta la corteza frontal posterior, caudal al fórnix y a nivel del hipocampo. (Figura 3-2). Estas áreas comprenden funcionalmente la corteza motora primaria del ratón (M1), motora secundaria (M2) y sensorial primaria del tronco según el atlas de ratón de Paxinos y Franklin (Figura 3-2) (83). El estudio en el cerebelo comprendió principalmente las folias (Figura 3.3), constituidas por la corteza del cerebelo. Las muestras se colocaron en un vibrátomo marca Leica (VT1000-S) y se obtuvieron series de cortes coronales de corteza y sagitales de cerebelo de 50µm de espesor. El cerebelo se evaluó desde el plano más lateral hasta el medial con la presencia de las diez folias cerebelares (Figura 3.4). Los cortes se recogieron en cajas de Petri pequeñas (2,5 cm de diámetro) que contenían PBS. En estos recipientes se mantuvieron los cortes durante todo el procedimiento inmunohistoquímico, en flotación y agitación constante a temperatura ambiente (20°C).

Figura 3-1. Diagrama de la distribución de las capas de la corteza cerebral frontal de ratón.



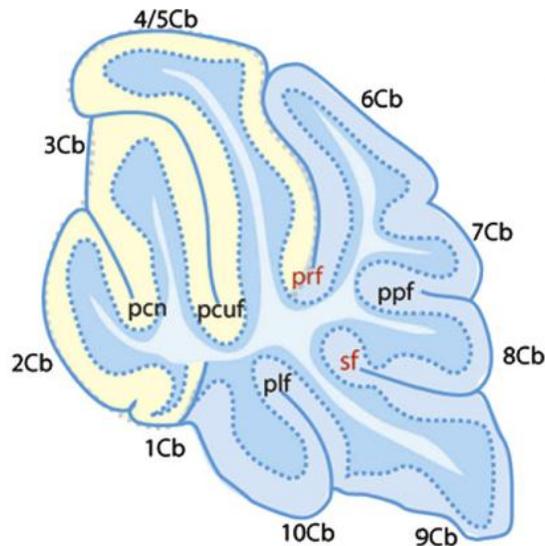
Fuente: The Mouse Nervous System: Charles Watson y George Paxinos (79).

Figura 3-2. Imágenes de las áreas de estudio en plano coronal del cerebro de ratón.



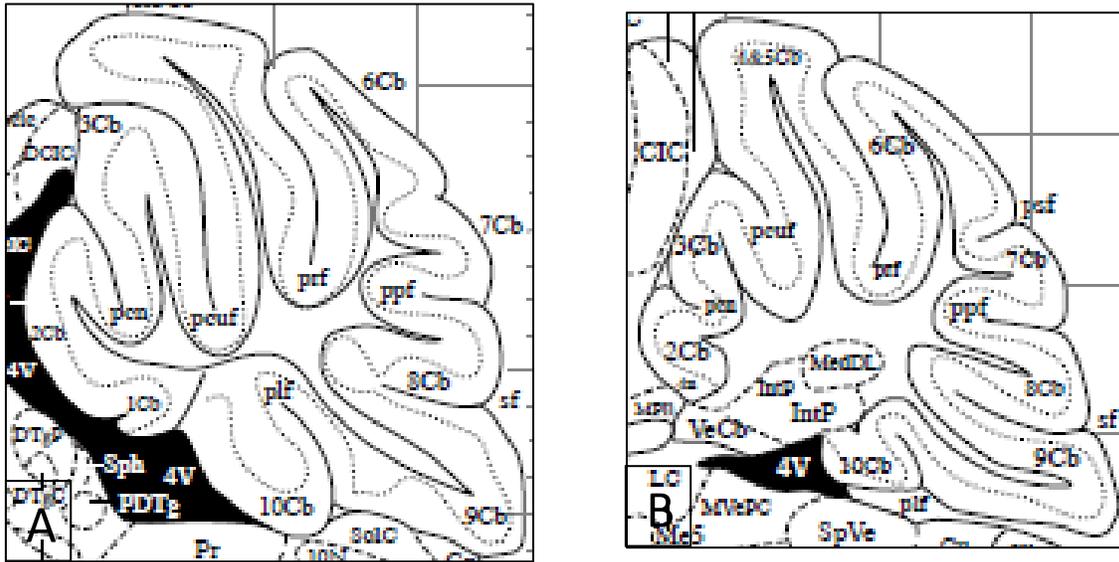
A. Corte coronal al nivel de la corteza motora primaria (M1) de la parte anterior. **B.** Corte a nivel de la corteza motora primaria (M1) posterior, corteza motora secundaria (M2) y somestésica primaria del tronco (S1Tr), regiones CA1, CA2, CA3 del hipocampo; DG, giro dentado; PoDG, capa polimórfica del giro dentado. Adaptados de: Paxinos y Franklin (83).

Figura 3-3. Diagrama de la distribución de las folias del cerebelo de ratón.



Fuente: The Mouse Nervous System: Charles Watson y George Paxinos (79).

Figura 3-4: Imágenes de las áreas de estudio en plano sagital de cerebelo de ratón



Vista sagital de cerebelo **A.** plano medial **B.** Plano lateral. Cb: Folia Cerebelar, pcn: fisura precentral, pcuf: fisura preculminada, prf: fisura primaria, ppf: fisura prepiramidal, psf: fisura posterior superior, plf: fisura posterolateral.

Fuente: The Mouse Brain: George Paxinos, Keith B. J. Franklin (83)

3.4. Estudio Histológico (H&E).

En tejidos fijados con PFA 4 % para la histología básica convencional se realizó la coloración hematoxilina-eosina (H&E) para identificar posibles cambios histopatológicos en la distribución neuronal, inducidos por el virus del Zika en la corteza y el cerebelo de los ratones. Se procesaron secciones coronales de corteza y sagitales de cerebelo en 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 con 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 después la coloración con eosina; a continuación, los cortes se deshidrataron con pases por isopropanol, etanol y xilol. Finalmente se hicieron preparaciones permanentes utilizando Entellan® (Merck) como medio de montaje.

3.4.1. Visualización de calcificaciones (Von Kossa).

El método de Von Kossa es utilizado para la visualización de depósitos de calcio en secciones histológicas. Para el procesamiento se utilizaron tejidos de corteza y cerebelo que fueron tratados en un histoprocador e incluidos en parafina. Se realizaron cortes coronales de corteza y sagitales de cerebelo de 7µm; estos se desparafinaron e hidrataron y luego se trataron con nitrato de plata al 1% a plena luz durante 60 minutos. A continuación, se realizaron lavados con agua destilada para después pasar el tejido por tiosulfato de sodio al 2.5% durante cinco minutos y lavarlo con agua destilada. Luego se realizó una coloración de contraste con rojo neutro al 1% durante 15 segundos (131). Finalmente, los cortes se deshidrataron con etanol en concentraciones ascendente y se aclararon con xilol y fueron montados en láminas con Entellan.

3.5. Detección inmunohistoquímica de marcadores.

Para la detección de los antígenos se utilizó el método inmunohistoquímico indirecto, específicamente la técnica de avidina-biotina-peroxidasa. Los cortes se sometieron a los siguientes tratamientos: incubación en NH₄Cl (Merck) 0,05 M, durante 30 minutos para retirar los residuos de aldehídos y luego con H₂O₂ (Merck) al 3%, durante 30 minutos, para inhibir la peroxidasa endógena. Luego se trataron, durante 30 minutos, con una solución compuesta por suero normal de caballo (ICN), albumina sérica bovina (Sigma) y tritón (ICN) con el fin de bloquear sitios de reacción inespecífica. Para la detección de los antígenos de interés los cortes se incubaron toda la noche con los siguientes anticuerpos: anti-calbindina (Sigma mono-clonal, dilución 1:2500); anti-parvoalbúmina (Sigma monoclonal, 1:2500); anti-calretinina (Chemicon policlonal, 1:1500); anti-NeuN (Chemicon policlonal 1:2500); anti- MAP2 (Santa Cruz policlonal, 1:2500), anti-GFAP (Roche policlonal 1:1000), anti-S100B (Abcam policlonal, 1:500). Luego se realizó la incubación de los cortes, durante dos horas, con anticuerpo secundario anti-conejo (Sigma, 1:400) para los anticuerpos policlonales y anti-ratón (Sigma 1:600) para los anticuerpos monoclonales. El tratamiento posterior se realizó con el complejo ABC (Vector Ref. SK4000), durante dos horas. Para el revelado se utilizó como cromógeno el Kit comercial DAB-Niquel (Vector Ref. PK4100). Se estandarizaron las diluciones y los tiempos necesarios de revelado para

cada marcador (Ver Anexo **C**), también se procesaron cortes para la detección inmunohistoquímica de Zika (Ver Anexo **B**). Como control negativo se procesaron cortes en los que se omitió el anticuerpo primario. Los cortes fueron colocados en láminas pretratadas con gelatina y montados con Entellan (Merck) (103) (110) (128) (129).

3.6. Estudio de la morfología dendrítica (Golgi Cox).

A los cerebros de ratones perfundidos con solución salina al 0.9% y luego fijados por una hora con PFA 4%, se les aplicó el protocolo modificado de Golgi-Cox (112,114), como se describe a continuación: Los encéfalos completos se colocaron en la solución Cox (debe ser preparada 5 días antes para su maduración). Esta solución contiene bicromato de potasio al 5%, cloruro de mercurio al 5% y cromato de potasio al 5%. Los cerebros permanecieron en la solución Cox durante 14 días en frascos ámbar y luego fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% durante 5 días. Después se cortaron en rodajas de 5 mm de espesor, coronales para el estudio en corteza y sagitales para el cerebelo a partir de los cuales se obtuvieron cortes de 200 µm con un Vibrátomo Leica VT 1000; estos se recogieron en una solución de sacarosa al 6%. Los cortes fueron de aquí en adelante lavados con agua destilada durante 1 minuto después de cada tratamiento y mantenidos en oscuridad: primero se trataron con hidróxido de amonio durante 30 minutos, después fueron dejados en una solución de fijador fotográfico Kodak, durante 30 minutos, finalmente se realizó el último lavado con agua destilada durante 1 minuto. A continuación, los cortes se deshidrataron con etanol en concentraciones ascendentes (50% hasta 100%) para luego ser sumergidos en una solución compuesta por cloroformo, xilol y etanol absoluto en partes iguales durante 10 minutos. Finalmente, los cortes fueron montados en láminas portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá (126) (128).

3.7. Análisis cualitativo y cuantitativo.

Las preparaciones inmunohistoquímicas se analizaron primero cualitativamente y se tomaron fotografías para determinar si había cambios aparentes inducidos por la infección con virus del Zika en la distribución (citoarquitectura) de cada una de las poblaciones celulares reconocidas con cada uno de los marcadores. Luego se llevaron a cabo conteos celulares en áreas definidas para establecer posibles efectos de la infección en el número

de células inmunorreactivas por cada uno de los marcadores. Para la corteza cerebral los conteos se hicieron en campos de 1mm^2 . Adicionalmente, en un microscopio con cámara digital se realizó captura de imágenes que posteriormente se analizaron mediante el programa ImageJ para determinar el posible efecto de la infección en la expresión inmunohistoquímica de las proteínas utilizadas como marcadores. Para ello se midió la intensidad de la inmunotinción (inmunorreactividad) de cada marcador celular. Este procedimiento también se conoce como 'densitometría óptica'.

Para llevar a cabo el análisis estadístico en cada una de las variables de las muestras procesadas por inmunohistoquímica se tomaron cinco casos de animales infectados (unidades experimentales) con sus respectivos controles. En cada unidad experimental se seleccionaron cinco cortes con las mismas características neuroanatómicas para realizar los conteos de células inmunorreactivas y la densitometría óptica, en cortes coronales de corteza cerebral y en cortes sagitales de cerebelo. Para los conteos se utilizó un microscopio Zeiss, dotado con un micrómetro de malla Netzmier de 1mm^2 ; estos conteos se realizaron con el objetivo 10X. Para el análisis densitométrico se digitalizaron imágenes tomadas a partir de los cortes con el programa CAPTURE PRO 6 para su posterior análisis con el programa Image J (142) (129) (140).

Se realizaron observaciones de los preparados de Golgi, en un microscopio provisto de cámara digital. Se capturaron imágenes en diferentes planos de enfoque (programa Capture Pro 6) y luego se realizaron reconstrucciones que fueron analizadas mediante el programa NeuronJ (ImageJ) para comparar el posible efecto de la infección por Zika sobre la citomorfología neuronal, especialmente en la arborización dendrítica (128) (129) (68). Esto se considera un análisis semicuantitativo, por su naturaleza, es difícil llevar a cabo análisis estadísticos en estudios neuronales con la técnica de Golgi.

Los datos obtenidos fueron tratados en el programa estadístico InfoStat. Debido a que los datos no presentaron distribución normal se utilizó la prueba de Wilcoxon, una prueba no paramétrica.

3.8. Consideraciones Ambientales.

En Colombia, la normatividad jurídica que regula la experimentación animal está dada por: la ley 84 de 1989 Por la cual se adopta el “Estatuto Nacional de Protección de los Animales”. La Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud “Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, en su Título V “La investigación Biomédica en Animales”.

La normatividad interna del Instituto Nacional de Salud cuenta con diversidad de manuales e instructivos para garantizar estas condiciones, entre los que se encuentran: INT-R04.0000-001 “Criterios éticos y técnicos para el cuidado y uso de animales para la experimentación” cuyo objetivo es describir las pautas adecuadas para la utilización y manejo ético de los animales de laboratorio que son empleados en la unidad de experimentación, y que se alojan en el bioterio del INS.

Debido a que los mecanismos de la disfunción del sistema nervioso en las enfermedades causadas por el virus Zika sigue siendo poco conocidos (5) (4) (41) (45), consideramos que esta investigación es importante para la salud humana y para el avance del conocimiento científico.

Los animales seleccionados para la experimentación hicieron parte de los resultados del macroproyecto que contempla la obtención de un modelo animal para la investigación en Zika y se procuró el uso del mínimo número requerido de animales para obtener resultados científicamente válidos. Los animales se obtuvieron y fueron mantenidos en el Bioterio del INS en condiciones adecuadas que cumplían con las reglamentaciones sanitarias vigentes.

Como investigadores estuvimos comprometidos a tratar a los animales como seres sensibles y considerar como un imperativo ético el cuidado y evitar o minimizar el discomfort, la angustia y el dolor. Todo procedimiento fue realizado con sedación o anestesia apropiada.

Todo el trabajo experimental de la investigación se limitó a trabajo en laboratorio. Mediante la manipulación de muestras de animales (ratones) de los cuales se procesó el sistema nervioso para el estudio histológico, histoquímico. Para ello se utilizaron la

mínima cantidad de reactivos, los cuales se manejaron y descartaron, siguiendo procedimientos de bioseguridad ya establecidos para cada uno de los laboratorios del INS.

La cantidad de animales que se utilizó fue limitada y las personas encargadas de su manipulación tenían experiencia previa. El Instituto Nacional de Salud a través 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 políticas ambientales que tiene como objetivo disminuir y/o mitigar los impactos negativos que se puedan generar al ambiente y la salud, por medio 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 del Zika en ratones.

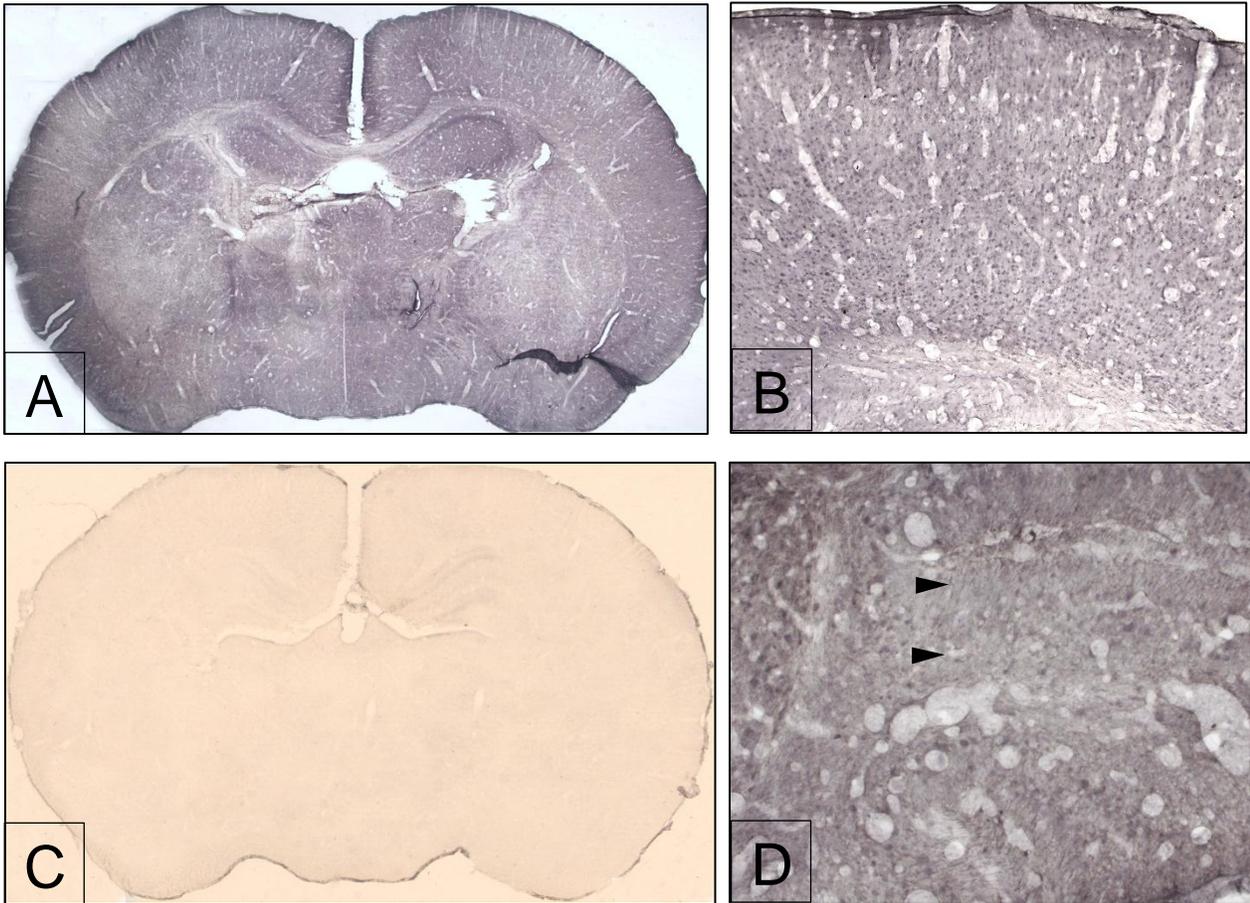
La inoculación intraperitoneal con 9.4×10^6 PFU/ml de virus Zika generó en todos los ratones en experimentación la manifestación de signos neurológicos de la enfermedad. El carácter positivo de la infección en el tejido nervioso se confirmó mediante PCR y localización inmunohistoquímica de antígenos virales en el encéfalo (Figura 4-1).

Los signos propios de la enfermedad se percibieron a partir del sexto día postinoculación. Inicialmente los ratones infectados manifestaron disminución progresiva en el aumento de peso de los neonatos, indiferencia al medio, poca actividad, hipersensibilidad al tacto, hipotonía. Estos se acentuaron progresivamente hasta el día diez p.i. En este punto los ratones presentaron parálisis en uno o los dos miembros posteriores, desencadenando un estado de postración. Durante el tiempo de desarrollo de los signos de la enfermedad se evidenció pérdida notoria de peso en comparación con los ratones control (Figura 4-2).

El estado más avanzado de la enfermedad y la muerte de los ratones se presentó en el día once postinoculación, pero todos los parámetros de este estudio se evaluaron con ratones sacrificados en el día diez p.i. En esta fase de la enfermedad los ratones han perdido movilidad en las extremidades posteriores, tienen una reducción drástica de peso y algunos se encuentran postrados (Figura 4-3B). En el momento de realizar la extracción de los encéfalos se observó una disminución evidente en el tamaño del encéfalo de los ratones infectados en comparación con sus controles (Figura 4-3C).

En una vista macroscópica de los encéfalos de algunos de los ratones infectados se podían observar a simple vista pequeñas áreas superficiales en la corteza y el cerebelo con tonalidades blanquecinas que sugerían la presencia de calcificaciones (Figura 4-3C), esta misma coloración fue evidente en experimentos previos, con ratones posnatales inoculados por vía intracerebral (Figura 4-3D). La confirmación de la formación de calcificaciones en la corteza cerebral y el cerebelo se determinó a través del método de *Von Kossa* (Figura 4-6).

Figura 4-1. Inmunohistoquímica de Zika en encéfalo de ratón.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica para virus Zika en cortes coronales de cerebro de ratón. **A.** Expresión de antígenos virales en corte completo de cerebro. Se observan neuronas inmunorreactivas dispersas en la corteza cerebral y a nivel subcortical. **B.** Inmunorreactividad en la corteza frontal. Se evidencian células positivas en todas las capas corticales. **C.** Control negativo. Inmunohistoquímica desprovista de anticuerpo primario y no se presenta inmunorreactividad. **D.** Marcación positiva para Zika en cerebelo. Son evidentes células reactivas al antígeno viral en las capas de la corteza del cerebelo; Nótese la marcación en las capas molecular y granular interna (cabeza de flecha). Aumentos de A y C en 2,5X, B y D en 10X.

Figura 4-2. Valores del peso en gramos, durante diez días pos-inoculación, en el grupo de ratones control y en el grupo de animales inoculados con Zika.

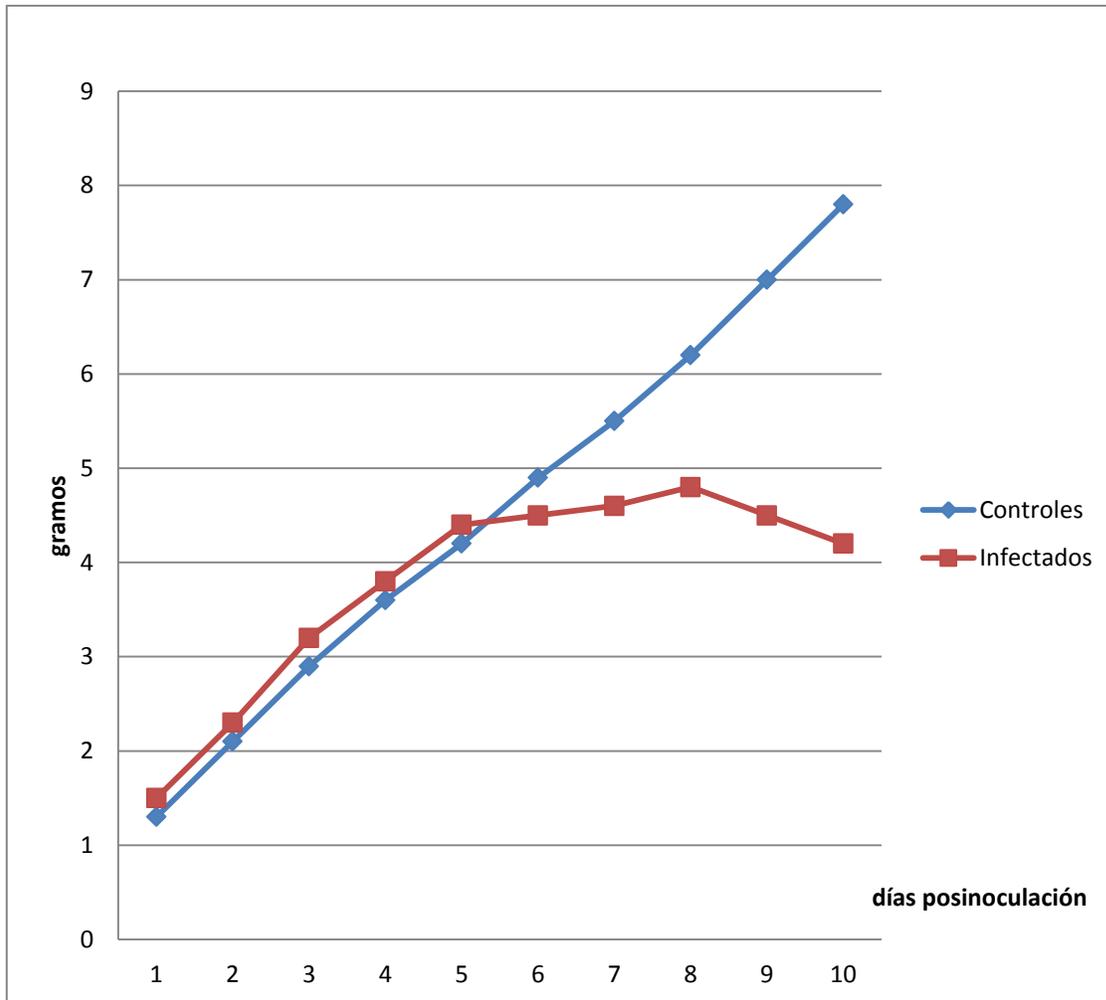
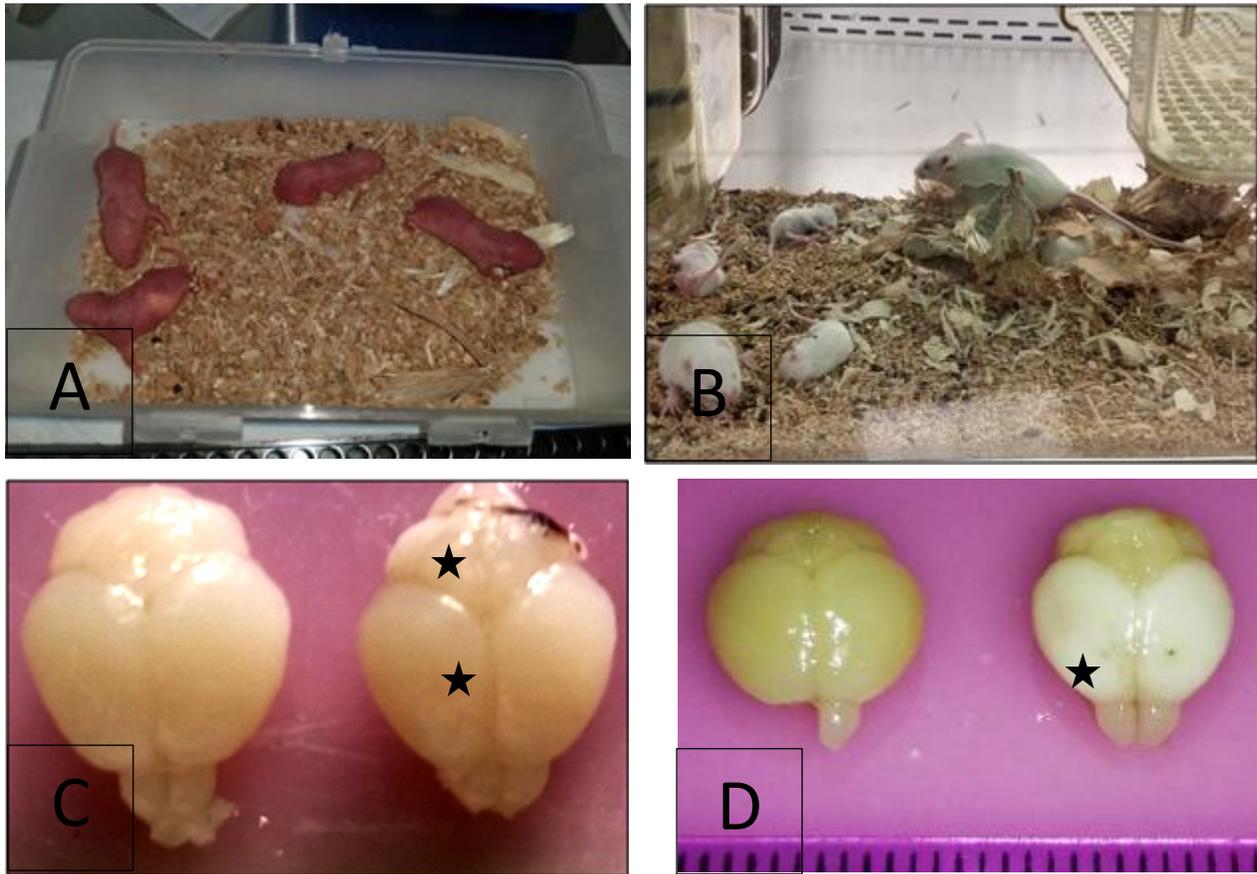


Figura 4-3. Signos clínicos en ratones inoculados con el virus del Zika.



A Ratones Balb/c de 1 día posnatal. Los ratones posnatales de 1 día pesaban entre 1.3 y 1.5 gr; en esta edad se llevó a cabo la inoculación intraperitoneal de virus Zika y junto con sus respectivos controles inoculados con solución vehículo desprovista de virus. **B.** Manifestaciones de la infección por el virus Zika a los 10 días postinoculación intraperitoneal. Los ratones posnatales presentan pérdida de movimiento, inactividad, parálisis y postración. **C y D.** Vista macroscópica de dos parejas de encéfalos de ratones control (Izquierda) e infectado (derecho). **C.** Inoculación intraperitoneal **D.** Inoculación intracerebral. Nótese que los controles tienen un tamaño mayor, el cerebelo y la corteza cerebral de los infectados presenta tonalidades blanquecinas que corresponde a calcificaciones, siendo esto más evidente en los ratones inoculados por vía intracerebral.

4.2 Descripción neurohistológica básica.

Se llevó a cabo en cortes coronales de corteza y sagitales de cerebelo de ratones infectados con Zika y sus controles con técnica de hematoxilina y eosina (H & E). Se observaron cambios importantes en la estructura del tejido infectado por el virus, principalmente en la citoarquitectura neuronal y la integridad del tejido.

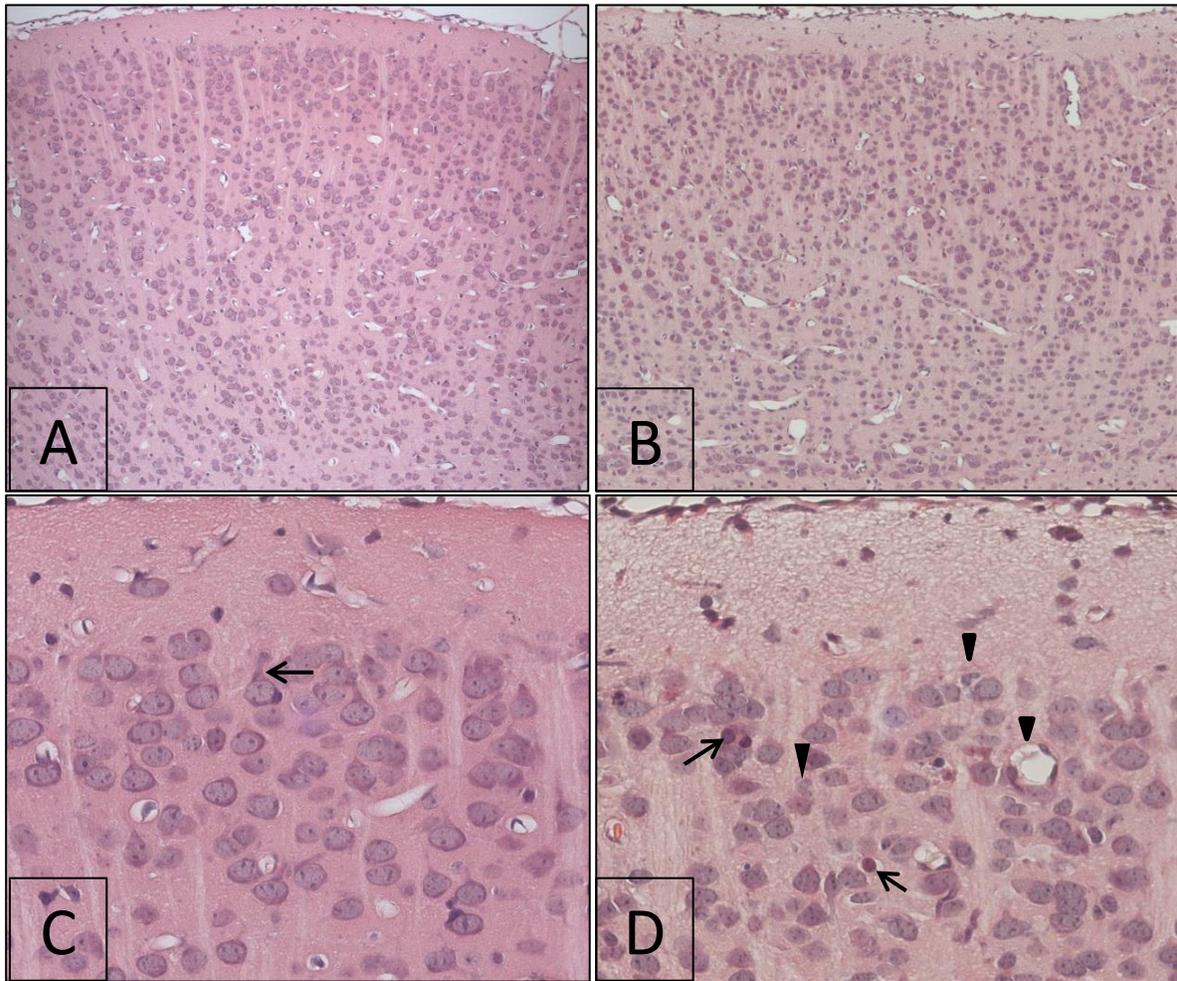
4.2.1 Corteza cerebral.

La tinción hematoxilina-eosina permitió obtener una visión general de las muestras de corteza cerebral. La hematoxilina posibilitó la caracterización de las estructuras ácidas en tonos azul y púrpura como fue los núcleos celulares; y la eosina que tiñe componentes básicos en tonos de color rosa, como fue la tinción del citoplasma de las neuronas.

En una observación panorámica de la corteza frontal de los ratones, se notó un patrón de distribución uniforme de células en todas las capas con excepción de la capa I que fue notablemente menor (Figura 4-4). Se podían distinguir grandes neuronas con núcleos prominentes y tenuemente teñidos, de diámetros entre 50 y 108 μm a través de las capas corticales, relativamente alineadas y cercanas entre sí, con dendritas apicales dirigidas hacia la piamadre. También se reconocieron otras pocas células, de núcleos pequeños intensamente basófilos, sin citoplasma aparente a su alrededor, que corresponde a células gliales (Figuras 4-4C).

Al comparar las muestras de los animales inoculados con el virus del Zika y sus controles (Figuras 4-4), se observaron diferencias notorias en el patrón de distribución de las células. En las muestras controles se puede identificar un número mayor de neuronas grandes y cercanas entre ellas (Figuras 4-4C), en los infectados prevalecen células de menores tamaños, con diámetros entre 45 y 85 μm y más distanciadas entre sí (Figuras 4-4D). En los infectados se evidenció un mayor número de células gliales, caracterizadas por sus núcleos pequeños e intensamente basófilos (figura 4-4D), se encontró en el tejido infectado un mayor diámetro de los vasos sanguíneos o vaso dilatación, y la presencia de cuerpos picnóticos, evidenciando procesos apoptóticos como son condensación del núcleo y citoplasma (figura 4-4D).

Figura 4-4. Coloración H & E en corteza cerebral de ratón normal e infectado con Zika.



Imágenes panorámicas de la coloración H & E en corteza frontal. **A.** Ratón control. Se observan numerosas neuronas distribuidas de forma homogénea en todas las capas corticales, excepto en la capa I que presenta apenas unas pocas células. **B.** Ratón infectado. Se logra diferenciar un patrón de organización celular más disperso y menos alineado. **C.** Ampliación del control. Se reconocen una mayoría de neuronas grandes, con núcleos que cubren casi todo el soma y una dendrita apical dirigida hacia la piamadre (flecha); las células se disponen alineadas en columnas verticales. **D.** Ampliación del infectado. Se identifican menos neuronas y mayor número de células gliales, caracterizadas por sus núcleos pequeños e intensamente teñidos (flechas). Las muestras presentaron acentuada vasodilatación y cuerpos picnóticos (neuronas exhiben condensación de su citoplasma) (cabeza de flecha). Aumentos A y B en 20X, C y D en 80X.

4.2.2. Cerebelo.

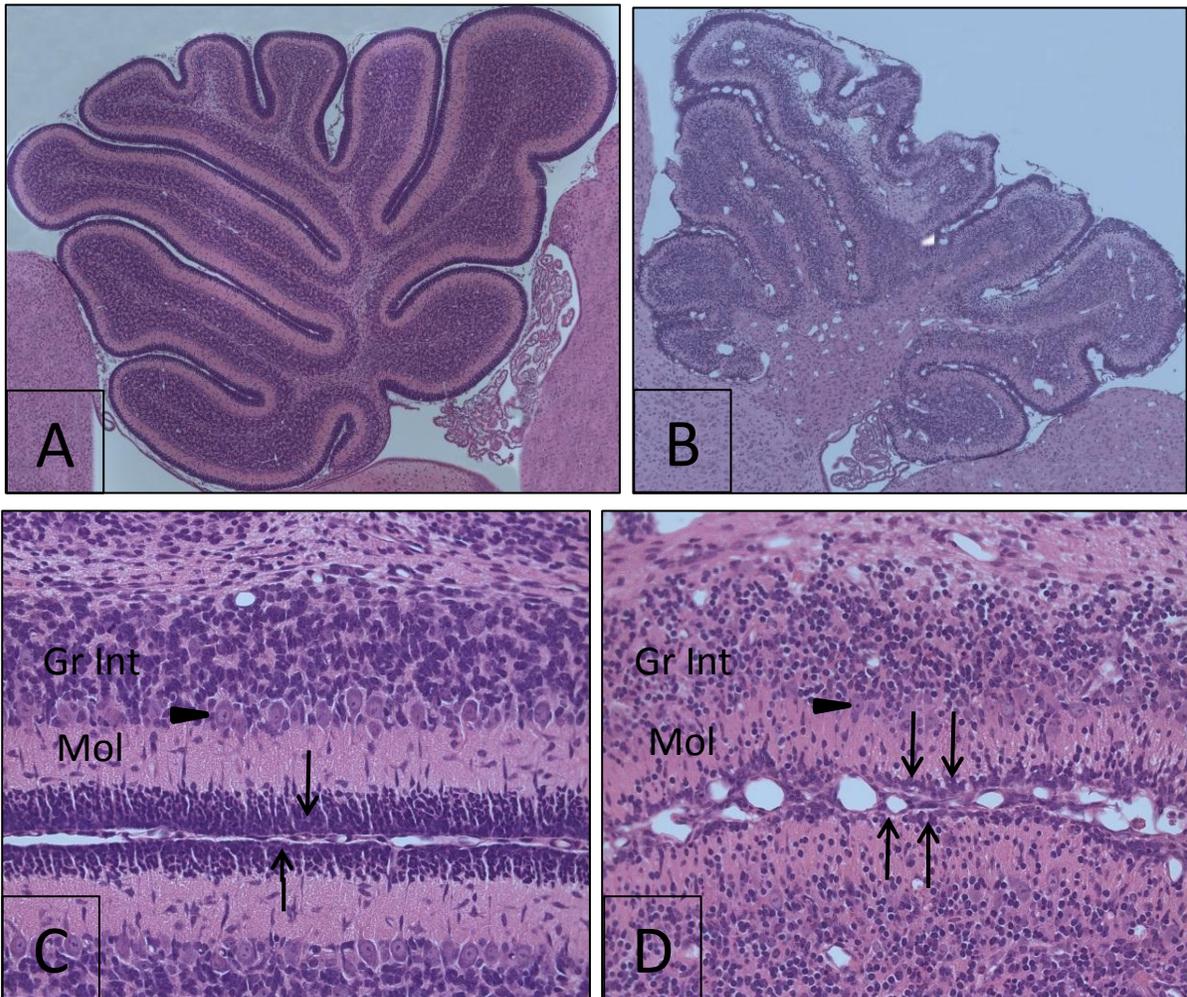
En vista panorámica del cerebelo de los ratones se observó un patrón de distribución uniforme en las diez folias y a su vez se definieron cuatro capas en la corteza del cerebelo de ratones posnatales de once días; capa granular externa, capa molecular, capa de células de Purkinje y capa granular interna (Figura 4-5).

Al observar los preparados histológicos de cerebelo se distingue la capa más externa, denominada capa granular externa (característica de la etapa del desarrollo); esta capa está compuesta por pequeñas células granulares inmaduras que migran hacia la capa granular interna. Posteriormente encontramos la capa molecular; en esta capa se identificaron una pequeña cantidad de células granulares provenientes de la capa granular externa, que estarían migrando a través de la capa molecular. Luego sigue la capa de células de Purkinje; esta se encuentra conformada por células de mayor tamaño con un citoplasma amplio y núcleo grande. Finalmente, en ubicación más interna se identificó la capa granular interna; que está conformada por abundantes y pequeñas células granulares (Figuras 4-5C).

Al comparar las muestras de los animales inoculados con el virus del Zika y sus controles (Figuras 4-5C y 4-5D), en los infectados se observaron alteraciones como fueron: diferencia notoria en el patrón de distribución de las células que conforman las cuatro capas de la corteza del cerebelo. En la capa granular externa fue evidente la disminución en el número de células granulares. En la capa molecular se exhibió un mayor número de células en comparación con los controles. También fue evidente un menor número de células de Purkinje, con un patrón de distribución alterado. En la capa granular interna de los animales infectados se observaron menos células (figura 4-5D), se distinguían vasos sanguíneos dilatados y otro hallazgo significativo fue la fragilidad del tejido infectado. Se pudo distinguir daño tisular más acentuado en las folias VI, VII y VIII (Figura 4-5B).

La tinción H & E en las muestras infectadas evidenció alteraciones histopatológicas muy notorias y más acentuadas que las observadas en la corteza cerebral, ya que el patrón de distribución, estructura y forma del tejido se ve atrofiado y con signos de hipoplasia del cerebelo.

Figura 4-5. Coloración H & E en Cerebelo de ratón normal e infectado con Zika.



Imágenes de la coloración H & E en cerebelo. **A.** Ratón control. Se observa una distribución homogénea de la tinción a través de las diez folias del cerebelo, se distinguen sus capas corticales. **B.** Ratón infectado. Nótese la tinción más tenue y menor tamaño (hipoplasia) en las folias y daño en el tejido. **C.** Ampliación del control. Se identifican las capas de la corteza del cerebelo; capa granular externa (flecha), capa molecular (Mol), células de Purkinje (cabeza de flecha), capa granular interna (Gra Int). **D.** Ampliación del Infectado. Es evidente menor número de células en la capa granular externa, capa de células de Purkinje y capa granular interna. En la capa molecular se reconocen más células dispersas que en el control. Nótese alteración en la estructura del tejido. Aumentos A y B en 10X, C y D en 40X.

4.2.3. Identificación de calcificaciones.

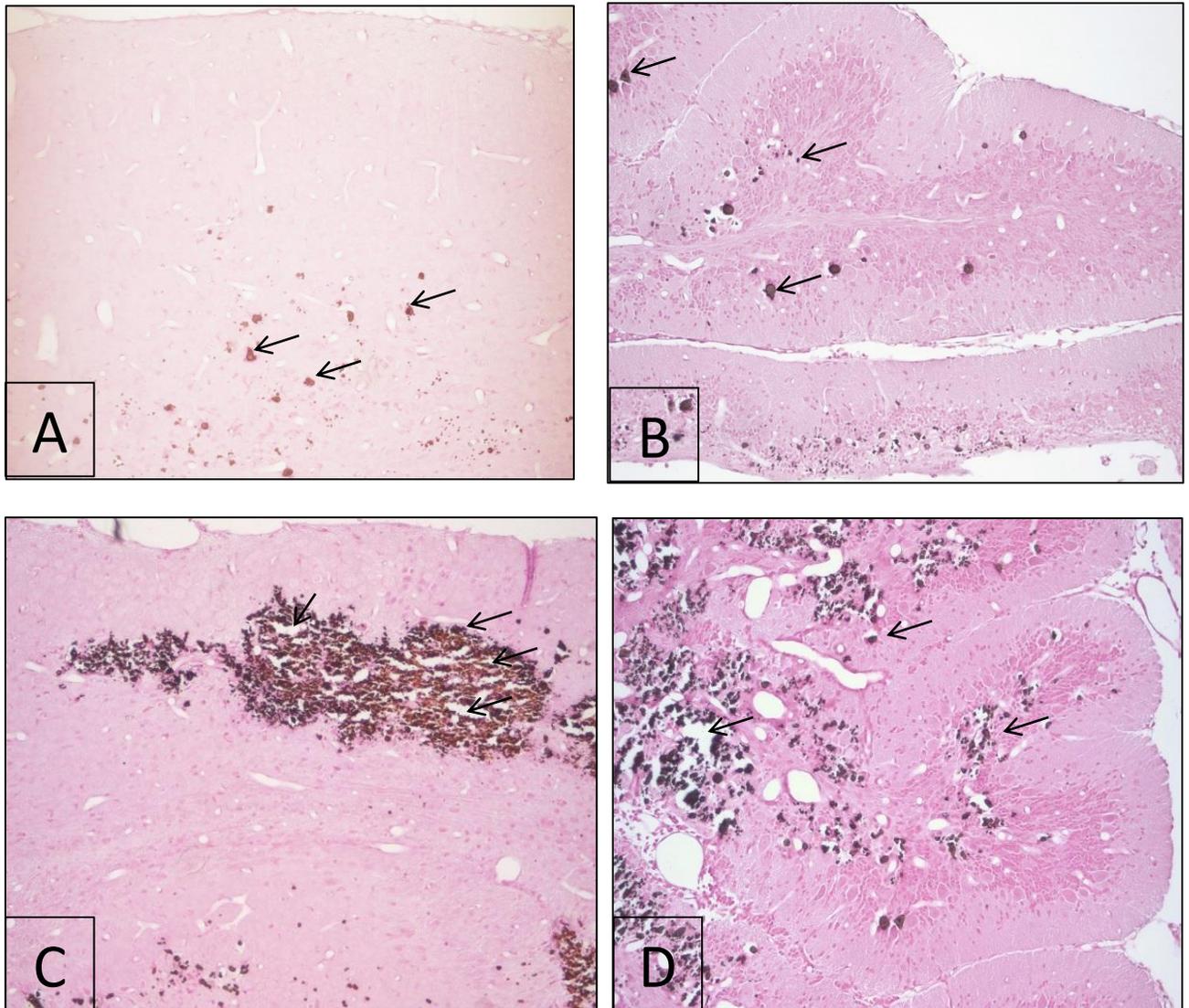
En una vista macroscópica de los encéfalos de ratones infectados se evidenció en el tejido pequeñas áreas en la corteza y el cerebelo con ciertas tonalidades blanquecinas. En el momento de realizar los cortes histológicos, en estas áreas, el tejido se tornó quebradizo, con pérdida de consistencia; debido a esto se evaluó el tejido por el método de impregnación argéntica de Von Kossa, por la presunción de que el virus del Zika podría estar generando el desarrollo de calcificaciones, como se ha visto en tejidos humanos.

Con el método de Von Kossa se logró evidenciar la formación de calcificaciones en el encéfalo de los ratones infectados con el virus del Zika. Los resultados indican que en las secciones histológicas de los tejidos se visualiza la formación de iones de calcio, que fueron evidenciados en la corteza cerebral y el cerebelo. La positividad del método se da por formación de depósitos de plata, generando una tinción negra, señalando la presencia de microcalcificaciones.

Las calcificaciones se vieron más acentuadas en algunas áreas más que en otras; En la gran mayoría de los cortes se encontró la positividad al calcio en pocas células, unas intensamente marcadas y otras con una marcación más leve, la tinción se vio principalmente a nivel intracelular en el citoplasma y el núcleo, sin embargo, también se evidencio marcación a nivel extracelular. El tejido que exhibió poca marcación mantenía sus características y fue un tejido fácil de manejar en los diferentes procesamientos, sin notarse un daño aparente (Figura 4-6A Y 4-6B).

El cerebelo fue el más afectado por la presencia de calcificaciones y donde se generó mayor daño al tejido, específicamente las folias VI, VII y VIII se tornó quebradizo, sufriendo disgregación con facilidad (Figura 4-6D). En la corteza cerebral se encontraron menos focos de calcificaciones y fueron más acentuados en la corteza frontal posterior entre las capas III y V (Figura 4-6C). En la corteza las calcificaciones generaron menos daño al tejido.

Figura 4-6. Identificación de calcificaciones en la corteza y el cerebelo de ratones infectados con Zika.



Imágenes de la impregnación argéntica de Von Kossa y tinción de contraste con eosina en ratones infectados con Zika. **A.** Corteza cerebral frontal anterior con tinción negra positiva para calcio en el soma de unas pocas células de las capas infragranulares (flecha). **B.** Cerebelo con tinción positiva para calcio en unas pocas neuronas de Purkinje y células granulares. **C.** Mayor densidad de células positivas para calcio en la corteza cerebral entre las capas III y V de la corteza frontal posterior. **D.** Mayor densidad de células positivas para calcio en las folias VI, VII y VIII del cerebelo. Nótese daño tisular en el área calcificada. Ampliaciones en 20X.

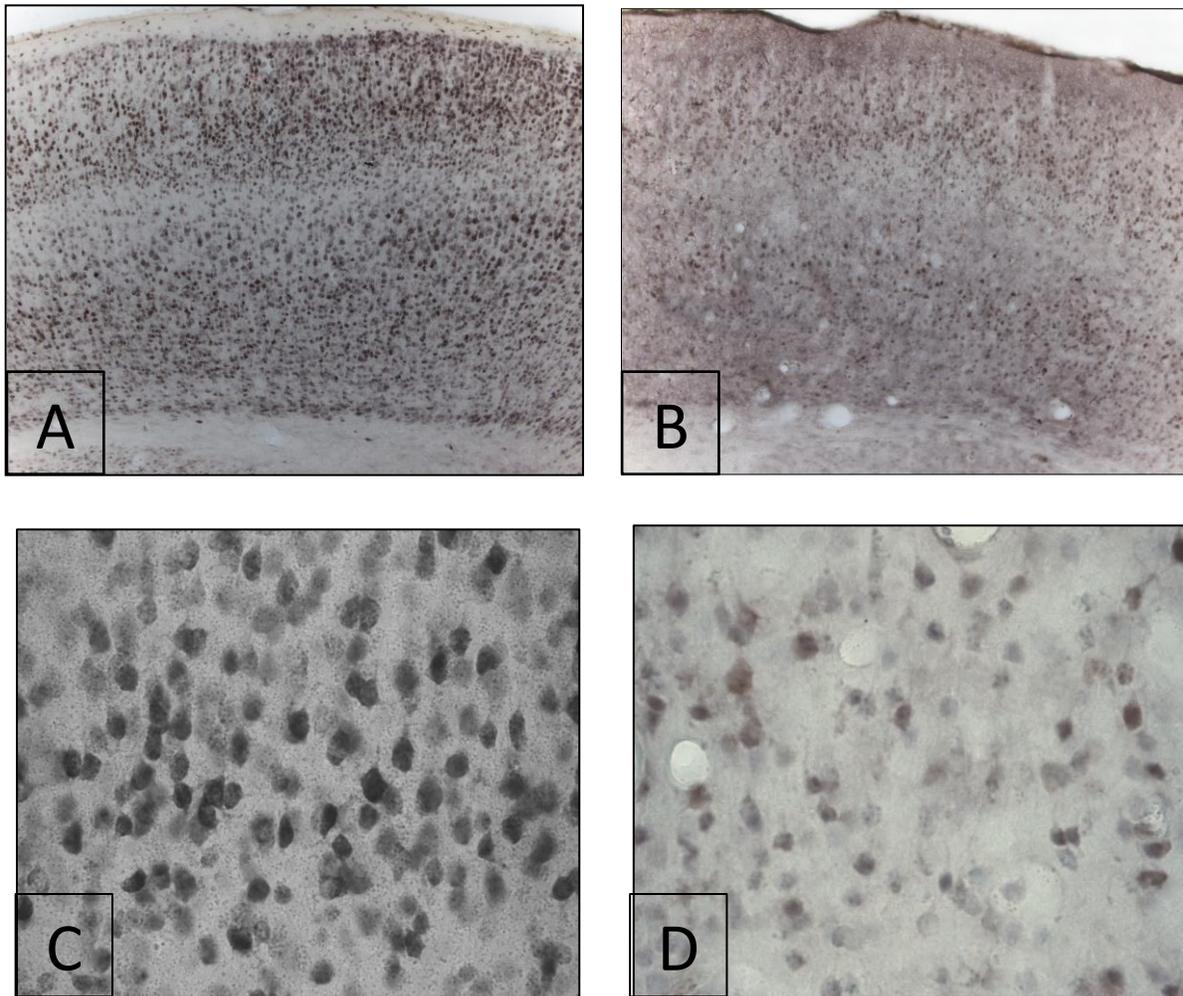
4.3. Distribución de la inmunorreactividad a NeuN y efecto de la infección con el virus del Zika en la corteza y el cerebelo.

En los animales utilizados como controles la inmunorreactividad a NeuN se presentó en toda la sustancia gris del encéfalo, en neuronas de diferentes tamaños y hubo fuerte inmunotinción de los perfiles neuronales (núcleo y pericarion). En la corteza cerebral de las muestras controles se observó un patrón de distribución uniforme de células en todas las capas, con excepción de la capa I que presentó un número de células notablemente menor (Figura 4-7A). En los cortes coronales de corteza de los animales infectados fue evidente la pérdida de inmunorreactividad a NeuN (figura 4-7B y 4-7D). Esto se manifestó principalmente por la disminución en el número de células NeuN+, con un promedio de células de 2452 en los controles y 1439 en los infectados (Tabla 4.1). La diferencia entre los controles y los infectados fue estadísticamente significativa ($p=0,0079$) en cada una de las seis capas corticales y también entre promedios de todas las capas juntas (Tabla 4.1).

En el hipocampo de las muestras infectadas se observó menor intensidad en la marcación, tanto en el neuropilo como en los perfiles neuronales (figura 4-8). Al realizar el estudio densitométrico se encontró pérdida de inmunorreactividad estadísticamente significativa ($p=0,0079$) en el giro dentado (Tabla 4-2) y en la capa de células piramidales de las áreas CA1, CA2, CA3 ($p=0,0079$) (Tabla 4-3).

En los cortes de cerebelo procesados para NeuN de los ratones controles se observó un patrón de distribución uniforme en las diez folias, caracterizándose la marcación positiva exclusivamente en la capa granular (Figura 4.9A y 4.9C). La densidad poblacional de las pequeñas células granulares dificultó realizar conteo neuronal, por lo tanto, se optó por medir la densidad óptica de la inmunotinción. En los animales infectados también se presentó positividad al marcador únicamente en la capa granular, y se evidenció pérdida estadísticamente significativa del marcador en las folias VI ($p=0,0159$), VII ($p=0,0079$), VIII ($p=0,0079$), IX ($p=0,056$) y X ($p=0,0159$), sin embargo en las folias I-II ($p=0,841$), III ($p=0,547$), IV-V ($p=0,841$) no se encontró diferencia significativa. Al relacionar los promedios totales entre todas las folias la diferencia fue significativa ($0,0079$). (Tabla 4-4). Una característica común en las muestras infectadas de cerebelo fue el daño tisular muy acentuado en las folias VI, VII, VIII.

Figura 4-7. Efecto de la infección por virus Zika en la expresión de NeuN de la corteza cerebral de ratón.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica de NeuN en la corteza frontal de ratón posnatal. **A.** Ratón control. Se observan somas neuronales distribuidos en todas las capas corticales. **B.** Ratón infectado. Es evidente la menor inmunotinción NeuN+ en todas las capas corticales. **C.** Ampliación del control. Se destacan abundantes somas neuronales. **D.** Ampliación del infectado. Se observa una menor inmunorreactividad y una disminución apreciable a simple vista en el número de células NeuN+. Aumentos A y B en 10X, C y D en 40X.

Tabla 4-1. Conteo de neuronas positivas para NeuN en la corteza frontal de ratones control e infectados con virus Zika.

Capas / Muestras	Controles								Infectados								Valor p
	1	2	3	4	5	Media	SD	1	2	3	4	5	Media	SD			
I	82	91	79	74	101	86	10.69	29	53	35	68	49	47	15.40	0.0079**		
II	281	253	256	261	278	266	12.87	183	153	159	214	148	172	27.34	0.0079**		
III	234	214	248	240	248	237	14.04	202	141	165	219	132	172	37.81	0.0159**		
IV	233	236	244	251	274	248	16.35	210	163	205	200	143	184	29.56	0.0079**		
V	738	787	696	747	938	781	93.43	360	423	495	497	393	434	61.17	0.0079**		
VI	785	875	865	748	904	835	65.82	284	455	593	300	528	432	136.93	0.0079**		
Totales*	2353	2456	2389	2321	2743	2452	170.02	1268	1387	1653	1497	1392	1439	144.32	0.0079**		

Por cada muestra se relacionan los promedios del número de células contadas en las seis capas corticales y en cinco cortes por cada caso.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Figura 4-8. Efecto de la infección por Zika sobre la expresión de NeuN en el hipocampo



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica de NeuN en el hipocampo. **A.** Ratón control. Obsérvese la marcación de neuronas NeuN+ en las neuronas piramidales del hipocampo (flechas) y el giro dentado (cabeza de flecha). Nótese la capa subgranular del giro dentado que no exhibe inmunorreactividad a NeuN (asterisco). **B.** Ratón infectado. Es evidente menor inmunorreactividad en la capa de neuronas piramidales del hipocampo CA1, CA2, CA3 y en el giro dentado. Aumento en 10X.

Tabla 4-2. Densitometría óptica de la inmunorreactividad a NeuN en el giro dentado de muestras de controles e infectados.

Densitometría de células inmunorreactivas a NeuN en el giro dentado		
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
Muestras (Ratones)	Controles	Infectados Zika
1	67.236	161.638
2	69.236	154.506
3	65.691	162.870
4	65.111	103.033
5	66.193	100.026
Promedio	66.693	136.415
Valor p= 0,0079**		

Por cada muestra se relacionan los promedios del estudio densitométrico en el giro dentado de cinco cortes por cada caso de estudio.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Tabla 4-3. Densitometría óptica de la capa de neuronas piramidales del hipocampo inmunorreactivas a NeuN.

Densitometría de la capa de células piramidales del hipocampo CA1, CA2, CA3.

Valor promedio escala de luz transmitida (0-255).

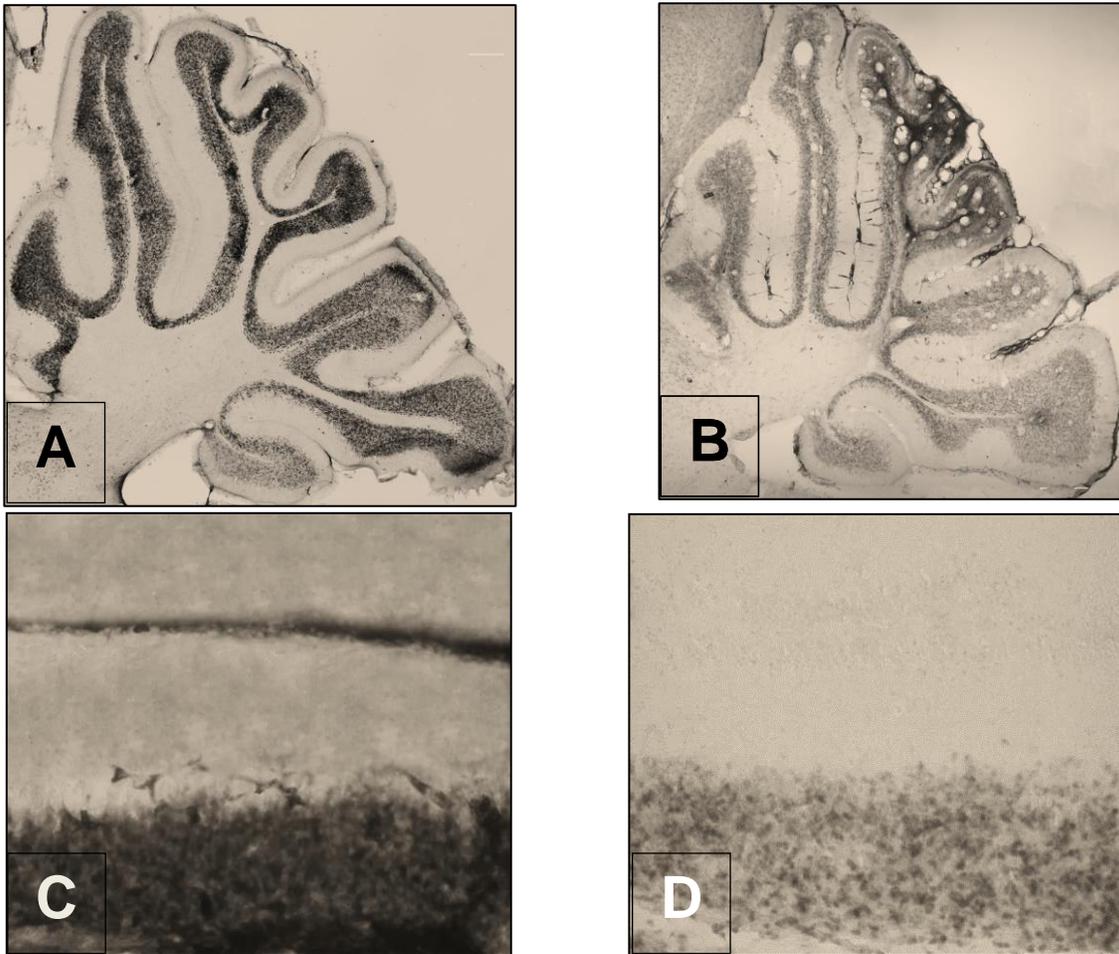
Muestras (Ratones)	Controles	Infectados
1	62.091	141.572
2	58.527	134.141
3	54.516	133.535
4	57.900	99.694
5	58.696	91.980
Promedio	58.346	120.184

Valor p = 0,0079**

Por cada muestra se relacionan los promedios del estudio densitométrico en las neuronas piramidales del hipocampo de cinco cortes por cada caso de estudio.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Figura 4-9. Efecto del virus sobre la expresión de NeuN en el cerebelo.



Imágenes panorámicas de la distribución de células inmunorreactivas a NeuN en el cerebelo. **A.** Ratón control. Se observa una inmunotinción densa en la capa granular de todas las folias del cerebelo. **B.** Ratón infectado. Se evidenció disminución significativa en la tinción de las folias VI, VII, VIII, IX y X. **C.** Ampliación del control. La reactividad fue intensa y delimitó la capa granular. **D.** Ampliación del infectado. Es evidente la disminución en la tinción de las células inmunorreactivas a NeuN. Aumentos de A y B en 10X, C y D en 40X.

Tabla 4.4. Densitometría óptica de células NeuN+ de la capa granular del cerebelo

Densitometría de neuronas NeuN+ en el cerebelo de controles.

Valor promedio escala de luz transmitida (0-255).

Muestras/ Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	Media
1	162,585	167,859	166,166	131,887	101,137	100,198	135,219	160,733	140,723
2	155,096	161,406	159,989	150,627	108,545	111,588	127,428	154,664	141,168
3	148,236	147,688	157,704	88,123	72,668	75,599	115,201	163,264	121,060
4	158,252	156,010	157,183	114,754	110,154	113,168	120,975	157,305	135,975
5	155,064	152,776	155,698	125,266	125,588	106,794	126,428	155,265	137,860
Media	155,846	157,148	159,348	122,131	103,619	101,469	125,050	158,246	135,357
SD	5,250	7,790	4,110	23,070	19,450	15,320	7,49	3,670	8,27

Densitometría de neuronas NeuN+ en el cerebelo de infectados

Muestras/ Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	Media
1	161,179	151,697	152,517	173,328	175,783	173,445	179,323	180,767	168,505
2	169,335	167,206	172,075	163,174	162,245	156,515	184,373	174,639	168,695
3	151,662	145,616	156,024	153,443	150,504	159,078	122,413	162,189	150,116
4	141,554	159,060	167,596	158,201	157,480	158,121	175,766	184,274	162,756
5	150,321	145,663	150,433	142,052	149,254	145,618	191,873	196,835	159,006
Media	154,810	153,848	159,729	158,040	159,053	158,556	170,750	179,741	161,816
SD	10,690	8,460	9,570	11,590	10,740	9,920	27,69	12,730	7,71
Valor p	0,841	0,547	0,841	0,0159**	0,0079**	0,0079**	0,056**	0,0159**	0,0079**

Por cada muestra se relacionan los promedios del estudio densitométrico en la capa granular del cerebelo de ratones controles e infectados.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

4.4. Expresión y distribución de calbindina y efecto de la infección con Zika

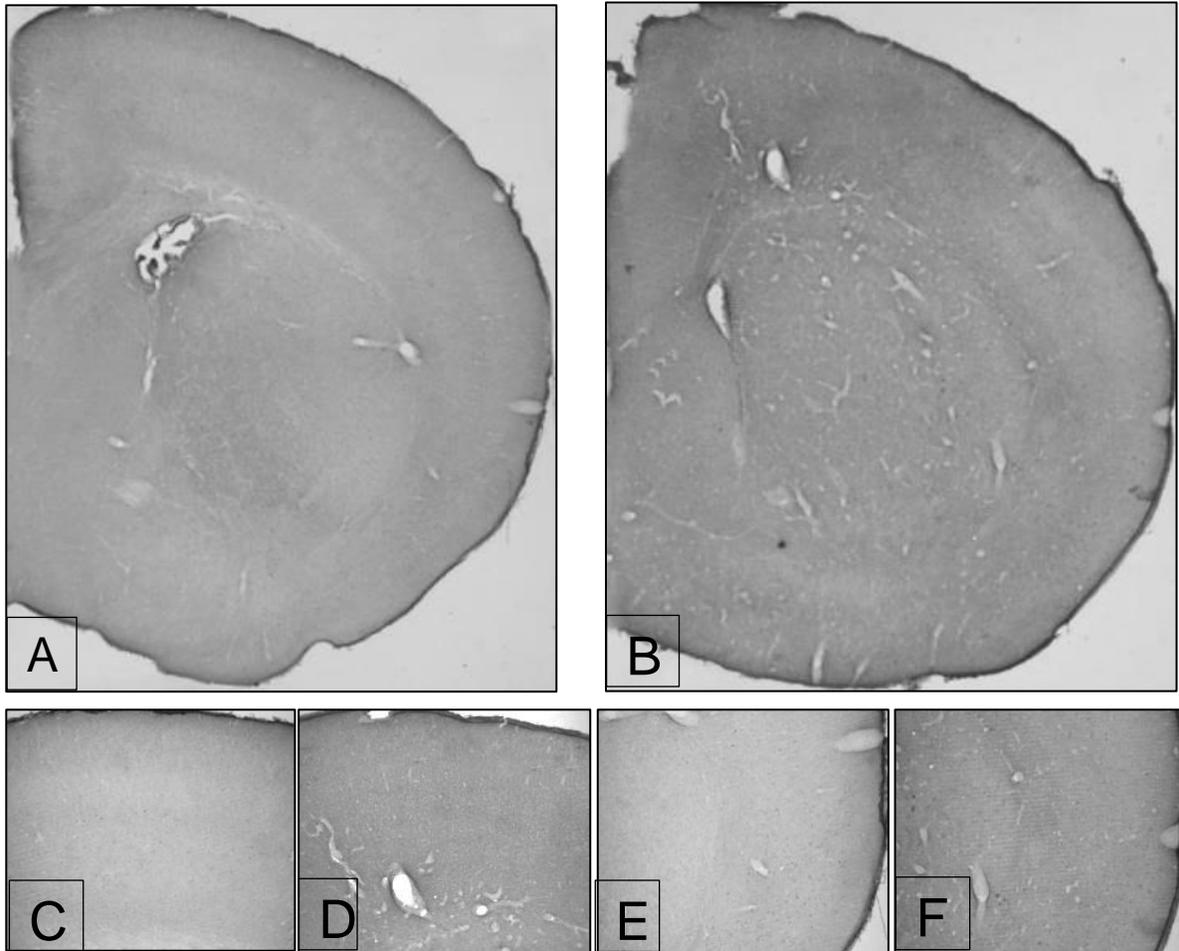
La inmunorreactividad a CB, en los cortes coronales de cerebro de ratón posnatal de once días, fue escasa (Figura 4-10), en comparación con el cerebelo (Figura 4-11). En la corteza frontal de los controles y de los infectados no se identificaron neuronas inmunorreactivas a calbindina (Figura 4-10C y D), se hallaron unos pocos somas neuronales CB+ en la corteza insular, y a nivel subcortical, en el tálamo y el hipotálamo. En los infectados sólo se notó un fondo más oscuro. En conclusión, no se observó inmunorreactividad para CB en la corteza cerebral.

En el cerebelo la inmunorreactividad a calbindina se evidenció de forma característica en las células de Purkinje. En los controles se identificaron alineadas a través de todas las folias del cerebelo, sin embargo, se observó que la folia IX presentó espacios desprovistos de células de Purkinje (Figura 4-11A). Igual ocurrió en los infectados. (Figura 4-11B).

Al realizar conteo de neuronas de Purkinje en todas las folias del cerebelo, se encontró disminución estadísticamente significativa ($p=0,0079$) en el número de células positivas a calbindina en las muestras infectadas con Zika, con un promedio total de 514 neuronas en comparación con el promedio de los controles que fue de 817 neuronas. Cuando se realizó el análisis por folias se constató la disminución significativa ($p=0,0079$) de células inmunorreactivas en las folias III, IV-V VI, VII y VIII mientras que las folias I-II ($p=0,4127$), IX ($p=0,1508$) y X ($p=0,0556$) no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4-5).

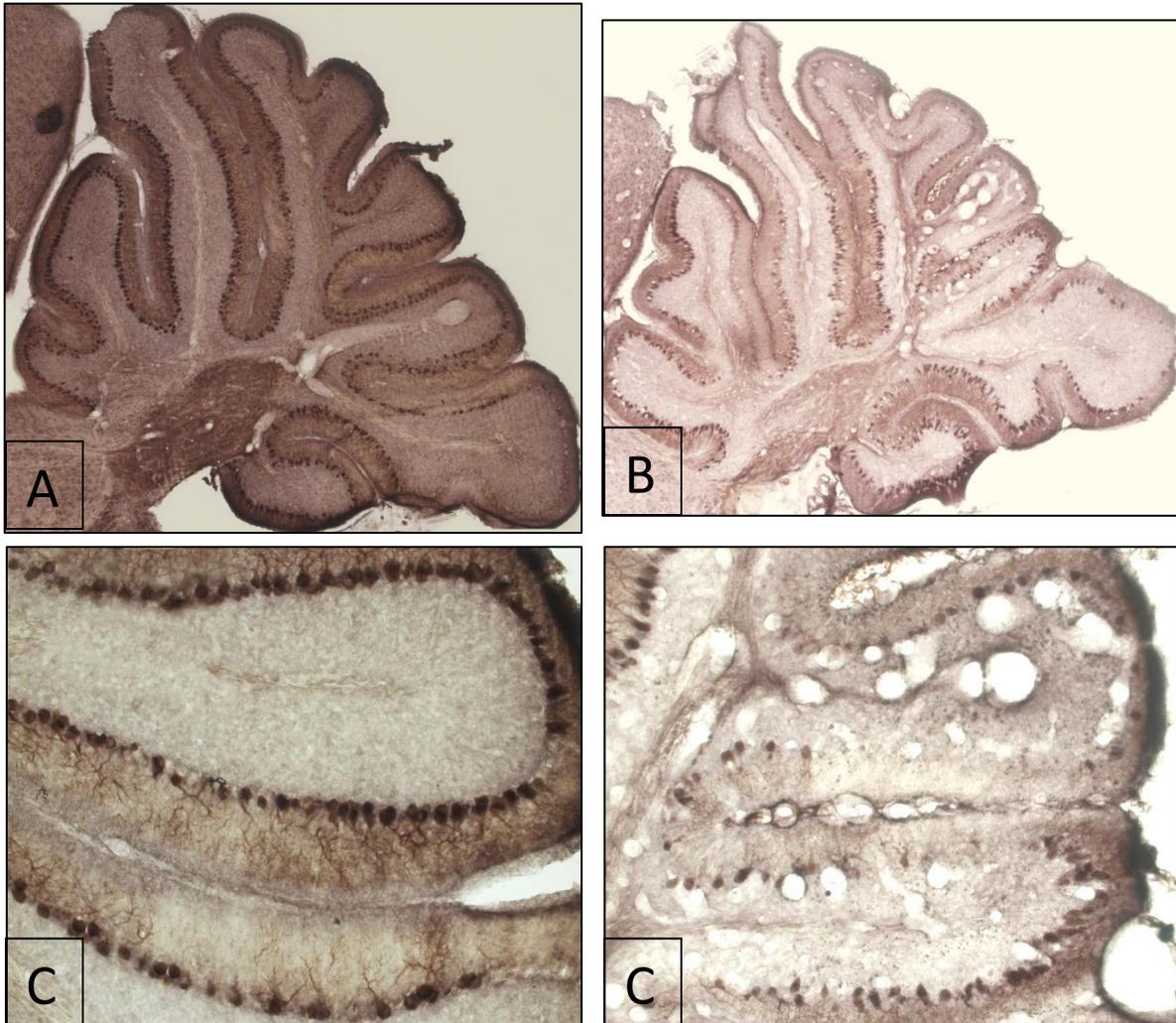
A simple vista las muestras infectadas se podían apreciar un poco más claras, tanto en la tinción de las dendritas sobre la capa molecular como en los somas neuronales. Por esta razón se realizó densitometría de las neuronas de Purkinje (treinta neuronas al azar por cada corte) y al realizar el estudio estadístico se identificó una disminución significativa ($p=0,0079$) en la tinción de estas neuronas en los animales infectados en comparación con sus respectivos controles (Tabla 4-6).

Figura 4-10. Inmunohistoquímica para calbindina en cortes coronales de cerebro.



Imágenes Panorámicas de la inmunohistoquímica para calbindina en cerebro. **A.** Ratón control. A simple vista casi no se observan neuronas positivas al marcador en la corteza cerebral y solo unas pocas a nivel subcortical. **B.** Ratón infectado. Se presenta la misma evidencia de células positivas a nivel subcortical. Ampliación de la corteza frontal. **C.** Ratón control. **D.** Ratón infectado. Hay ausencia de neuronas inmunorreactivas a calbindina. Ampliación de la corteza insular. **E.** Ratón Control. **F.** Ratón Infectado. Se logran distinguir unas pocas neuronas positivas a calbindina, no se observan diferencias entre controles e infectados, sin embargo, las muestras infectadas presentaron un fondo más oscuro. Aumentos A y B en 5X, C, D, E, F en 10X.

Figura 4-11. Efecto de la infección con virus Zika sobre la expresión de calbindina en el cerebello.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica de calbindina en cerebello. **A.** Ratón control. Se identifica la capa de células de Purkinje con intensa inmunoreactividad a calbindina. **B.** Ratón infectado. Es evidente la alteración en el tejido, notándose más espacios desprovistos de células positivas a calbindina. **C.** Ampliación del control. Distribución de las células de Purkinje intensamente teñidas y se reconocen sus procesos celulares en la capa molecular. **D.** Ampliación del infectado. Se observan menos células reactivas a calbindina y nótese alterada la citoarquitectura neuronal. Además, las folias presentan un área más reducida. Aumentos A y B en 10X, C y D en 20X.

Tabla 4.5. Conteo por folias de neuronas de Purkinje inmunorreactivas a calbindina en el cerebelo.

Conteo de neuronas reactivas a calbindina en el cerebelo de los controles

Muestras/ Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	Media total
1	50	99	190	176	68	105	59	68	815
2	64	116	194	168	66	90	64	64	826
3	82	135	155	129	69	102	63	68	803
4	74	140	150	125	57	97	91	81	815
5	95	166	136	125	63	79	89	75	828
Media	73	131,2	165	144,6	64,6	94,6	73,2	71,2	817,4
SD	17,1	25,35	25,65	25,22	4,83	10,41	15,47	6,76	10,06

Conteo de neuronas inmunorreactivas a calbindina en el cerebelo de los Infectados

Muestras/ Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	Media total
1	74	49	114	65	27	43	90	67	529
2	73	45	106	69	28	39	85	63	508
3	50	53	90	102	28	45	92	58	518
4	48	73	112	86	28	45	88	42	522
5	75	70	73	58	14	37	98	68	493
Media	64	58	99	76	25	41,8	90,6	59,6	514
SD	13,73	12,69	17,32	17,82	6,16	3,63	4,88	10,60	13,98
Valor p	0,4127	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,1508	0,0556	0,0079**

Por cada muestra se relacionan los promedios del conteo de neuronas de Purkinje.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Tabla 4.6. Densitometría de células de Purkinje inmunorreactivas a calbindina.

Densitometría de células de Purkinje inmunorreactivas a CB		
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
Muestras (ratones)	Controles	Infectados Zika
1	67,067	112,061
2	62,193	107,957
3	63,295	99,225
4	67,382	100,676
5	70,657	97,427
Promedio	66,12	103,47
$p=0.0079^{**}$	DS. 3,41	DS 6.25

Por cada muestra se relacionan los promedios del estudio por densitometría de treinta neuronas de Purkinje seleccionadas al azar por cada uno de los cinco cortes por muestra en el cerebelo de ratones controles e infectados.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

El conteo neuronal de las células de Purkinje permitió reconocer en los infectados, disminución del número de células positivas a calbindina y también la densitometría determinó disminución en la inmunotinción. El tejido infectado que fue procesado, presento todas las alteraciones de forma que se habían observado en los otros tejidos procesados para los demás marcadores neuronales, como la vasodilatación e hipoplasia. Calbindina no evidencio inmunorreactividad en la corteza frontal, la tinción, se presentó principalmente en el cerebelo, en las células de Purkinje, núcleos profundos y tallo cerebral.

4.5. Distribución de la inmunorreactividad a parvoalbúmina y efecto de la infección con el virus del Zika.

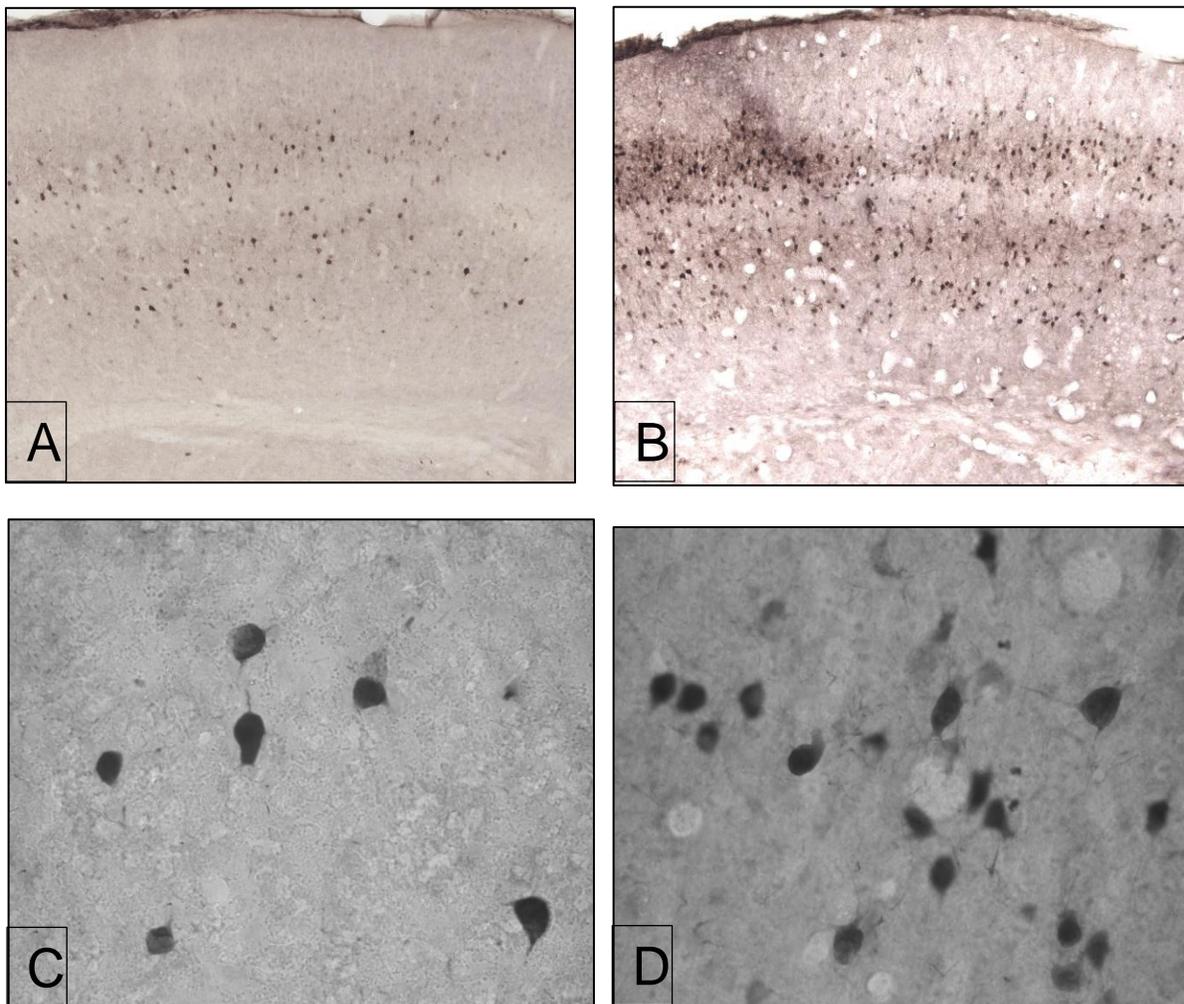
La inmunorreactividad a parvoalbúmina en los controles mostró un patrón de distribución regular tanto en la corteza cerebral como en el cerebelo. En la corteza las neuronas inmunorreactivas a PV se hallaron dispersas desde la capa II hasta la capa VI aunque la mayor proporción se encontró entre las capas III y V de la corteza frontal tanto en los controles como en los infectados (Figura 4-12). Las células inmunorreactivas exhibieron formas multipolares y bipolares de somas redondeados o ligeramente ovalados (Figura 4-12C). Es importante destacar que la infección con Zika en todos los experimentos acentuó la inmunotinción a PV (Figura 4-12B y D).

Se encontró aumento estadísticamente significativo ($p=0,0079$) en el número de células PV+ en la corteza frontal de los animales infectados. En un área de $100 \mu\text{m}^2$ el promedio de células PV+ en los controles fue de 84,5 y en los infectados de 159,9. Al realizar la estadística por capas el aumento fue significativo en las capas I ($p=0,0159$), II ($p=0,0159$), IV ($p=0,0079$) y V ($p=0,0079$) (Tabla 4-7). En el cerebelo de los animales controles fueron inmunorreactivas a PV las células de Purkinje, con una inmunotinción relativamente débil a simple vista. Estas neuronas se encontraron alineadas en todas las folias del cerebelo y sus dendritas distribuidas en la capa molecular mostraron también marcación positiva (Figura 4-13A). No se observó marcación en células de la capa molecular.

En los animales infectados la inmunotinción de las células de Purkinje fue mayor que en los controles (Figura 4-13). Se realizó densitometría óptica de 150 somas neuronales por cada muestra y se evidenció un aumento estadísticamente significativo ($0,0079$) en el material infectado (Tabla 4-9). Sin embargo, al realizar conteo de la capa de células de Purkinje, se evidenció una disminución estadísticamente significativa ($0,0079$) en el número de células PV+ de todas las folias del cerebelo en las muestras infectadas, que tuvieron en promedio 701 células positivas en comparación con los controles que en promedio fueron 1163 células de Purkinje PV+ (Tabla 4-8).

Es importante destacar que la infección con el virus Zika en todos los experimentos generó cambios en la organización citoarquitectónica del cerebelo. Las células de Purkinje perdieron su alineación debido a alteraciones en la consistencia del tejido (Figura 4-13D).

Figura 4-12. Efecto de la infección con virus Zika en la expresión de parvoalbúmina en la corteza cerebral.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica para PV en la corteza frontal. **A.** Ratón control. Se observan neuronas distribuidas desde la capa II hasta la capa VI, aunque la mayor proporción se encuentra en las capas III y V. **B.** Ratón Infectado. Nótese mayor inmunorreactividad a PV. **C.** Ampliación del control. Marcación de pocas células PV+ en la corteza frontal. **D.** Ampliación del infectado. Sobresale un mayor número de células inmunorreactivas a PV en la corteza frontal. Aumento A y B en 10X, C y D en 64X.

Tabla 4.7. Conteo de neuronas inmunorreactivas a parvoalbúmina en la corteza frontal.

Capas/ Muestra	Controles PV							Infectados PV							Valor p
	1	2	3	4	5	Media	SD	1	2	3	4	5	Media	SD	
I	0,0	0,2	0,0	0	0,0	0,04	0.09	0,2	4,3	1,6	0,5	3,6	2,04	1.84	0.0159**
II	0,0	0,0	0,7	0	0,2	0,18	0.30	0,3	4,7	3,9	1	6,6	3,3	2.62	0.0159**
III	1,5	0,0	3,0	3,4	3,8	2,34	1.57	2,8	26,3	9,6	28	29	19,14	12.09	0.0556
IV	11,0	5,8	15,3	10,6	12,7	11,08	3.48	15,7	46,0	21,9	30	39,6	30,64	12.41	0.0079**
V	58,2	44,0	64,2	54,85	58,66	55,98	7.49	71,8	88,5	82	79	95	83,26	8.89	0.0079**
VI	17,3	17,46	19,5	9,13	11,14	14,91	4.50	32,83	12,7	33,14	16	13	21,53	10.53	0.5476
Totales	88,0	67,46	102,7	77,98	86,5	84,53	13.04	123,63	182,5	152,14	154,5	186,8	159,9	25.63	0.0079**

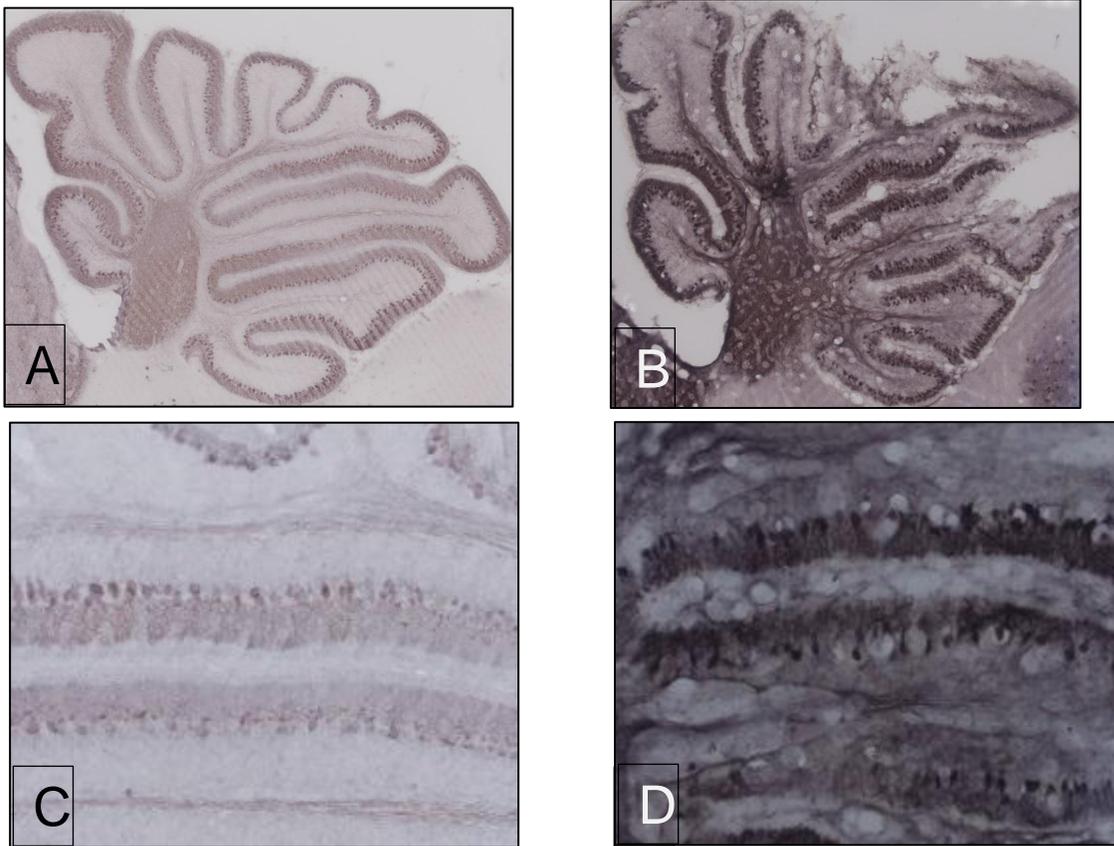
Por cada muestra se relacionan los promedios del conteo de células inmunorreactivas a parvoalbúmina en cinco cortes de corteza frontal por cada muestra de controles e infectados.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

El número de neuronas PV+ aumentó significativamente en las capas de la corteza frontal I, II, IV y V y al relacionar el número promedio de todas las capas, el aumento también fue significativo (Tabla 4-7).

En el cerebelo de las muestras infectadas la disminución del número de células de Purkinje fue significativa desde la folia III hasta la folia X, y cuando se relacionaron los promedios totales de cada una de las unidades experimentales la pérdida fue significativa (Tabla 4-8). Llama la atención que, aunque se presentara disminución del número de células positivas a PV, al mismo tiempo aumentó la inmunotinción de las células reactivas en las muestras infectadas, evidenciando un comportamiento diferencial relacionado con el aumento del marcador en las pocas células positivas a PV en comparación con las muestras controles (Figura 4-13 y Tabla 4-9).

Figura 4-13. Efecto del virus Zika sobre la expresión de parvoalbúmina en el cerebelo.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica para parvoalbúmina en cerebelo. **A.** Ratón Control. Se visualiza inmunorreactividad en la capa molecular de todas las folias y en los núcleos profundos. **B.** Ratón infectado. A simple vista se ve mayor inmunotinción en la capa molecular y en los núcleos profundos. **C.** Ampliación del control. Se distingue una inmunorreactividad tenue de las células de Purkinje y sus dendritas. **D.** Ampliación del infectado. Nótese menos neuronas de Purkinje PV+, sin embargo, la inmunorreactividad es considerablemente mayor y es notoria la alteración de la citoarquitectura neuronal. Aumento A y B en 10X, C y D en 20X.

Tabla 4.8. Conteo de neuronas de Purkinje inmunorreactivas a parvoalbúmina en las folias del cerebelo.

Conteo de neuronas inmunorreactivas a parvoalbúmina en el cerebelo de los controles

Muestras/Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	totales
1	96	150	256	196	80	125	180	102	1185
2	62	141	178	216	81	97	221	109	1105
3	120	148	254	194	87	115	212	91	1221
4	99	152	195	215	85	107	198	96	1147
5	112	148	189	204	83	104	213	105	1158
Media	97,8	147,8	214,4	205	83,2	109,6	204,8	100,6	1163,2
SD	22.25	4.15	37.57	10.3	2.86	10.76	16.15	7.16	43.28

Conteo de neuronas inmunorreactivas a parvoalbúmina en el cerebelo de los infectados

Muestras/ Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	totales
1	64	108	141	92	64	62	106	74	711
2	58	106	128	63	45	35	122	83	640
3	67	113	138	84	15	65	109	73	664
4	77	123	105	82	35	67	98	63	650
5	68	125	168	118	58	75	145	84	841
Media	66,8	115	136	87,8	43,4	60,8	116	75,4	701,2
SD	6.91	8.63	22.79	19.95	19.48	15.21	18.37	8.56	82.75
Valor p	0.0952	0.0079**	0.0079**	0.0079**	0.0079**	0.0079**	0.0079**	0.0079**	0.0079**

Por cada muestra se relacionan los promedios del conteo de neuronas inmunorreactivas a parvoalbúmina, de cinco cortes por cada muestra, en controles e infectados.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Tabla 4.9. Densitometría de neuronas de Purkinje inmunorreactivas a parvoalbúmina

Densitometría de células de Purkinje inmunorreactivas a PV		
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
Muestras	Controles	Infectados
1	126,604	40,825
2	120,266	40,541
3	114,576	39,549
4	128,496	45,116
5	129,628	46,466
Promedio	123,914	42,4994
P= 0.0079**	SD=6.35	SD=3.08

Por cada muestra se relacionan los promedios del estudio por densitometría de treinta células de Purkinje por cada corte y se evaluaron cinco cortes por cada caso.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

En las muestras procesadas para inmunohistoquímica de parvoalbúmina fue evidente el aumento en la inmunotinción de los infectados con Zika, sin embargo, al realizar conteo neuronal se determinó una disminución estadísticamente significativa en el número de células de Purkinje inmunorreactivas a PV. A nivel del cerebelo la reactividad a PV se presentó exclusivamente en la capa de células de Purkinje y sus procesos sobre la capa molecular, en el tallo cerebral y los núcleos profundos.

Contrario a los resultados en el cerebelo, los conteos de células en las muestras infectadas de corteza frontal permitieron confirmar aumento en el número de células positivas a PV.

4.6. Distribución de la inmunorreactividad a calretinina y efecto de la infección con el virus del Zika.

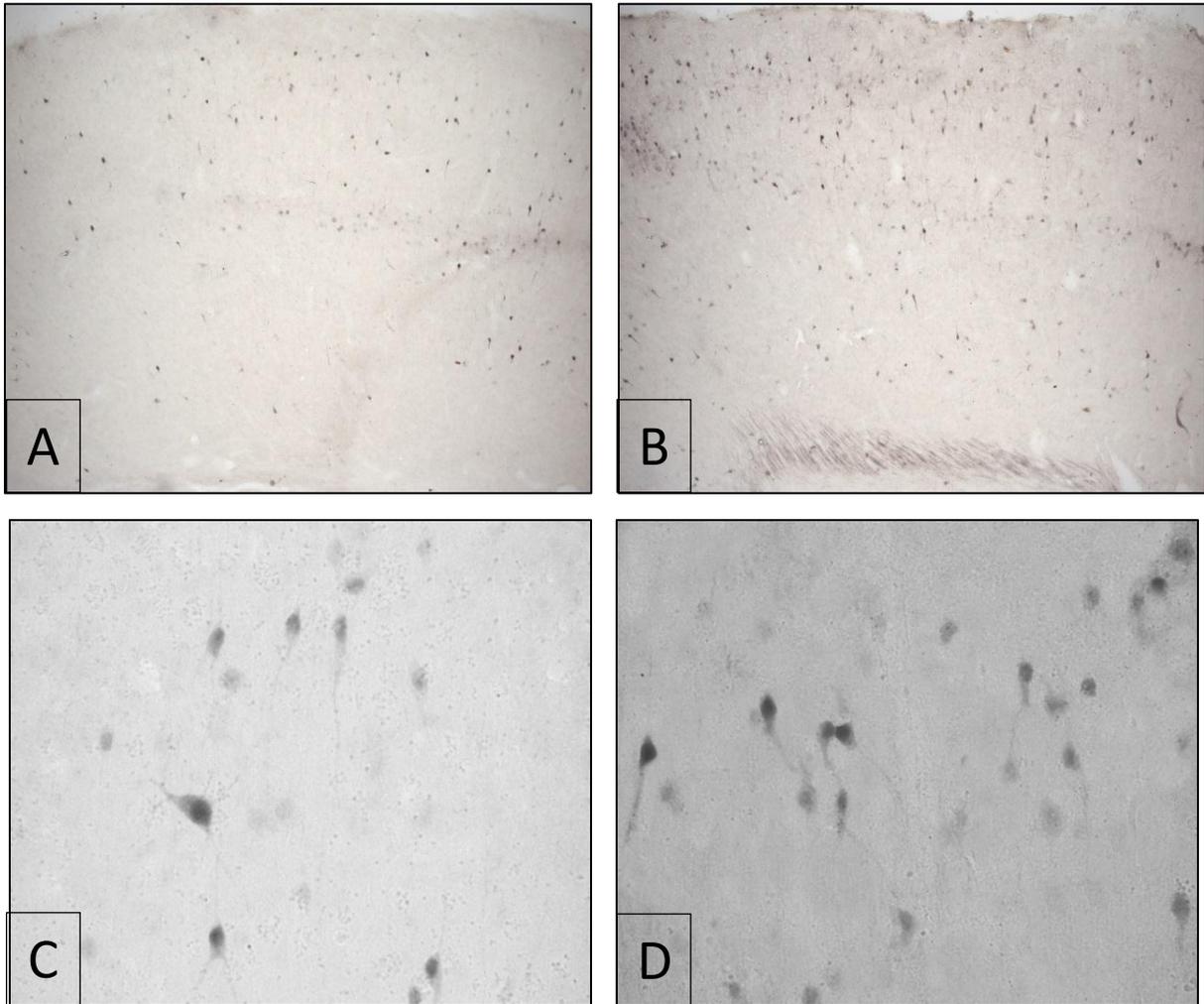
La inmunorreactividad a CR en la corteza frontal de los ratones normales se evidenció a través de todas las seis capas corticales, aunque el mayor número de células se concentró entre las capas II y V, fueron predominantemente células bipolares, con somas ovoides o fusiformes, cuyo eje principal, así como sus dendritas se orientaron en sentido perpendicular a la piamadre (Figura 4-14). Al comparar las muestras control con los infectados se notó a simple vista un aumento en el número de células positivas a CR en las muestras infectadas (Figura 4-14B y D), lo que se constató al realizar conteo neuronal en la corteza frontal.

Se encontró aumento estadísticamente significativo (0,0079) del número de células CR+ en las muestras infectadas, con un promedio total de 158 células por área de 1mm^2 , en comparación con la corteza frontal de los animales controles que tuvieron un promedio de 96,4 células CR+ (Tabla 4-10).

La inmunorreactividad a CR en el cerebelo se caracterizó por la tinción de pequeñas neuronas con una morfología celular de soma ovalado o redondeado, de un diámetro entre 9-12 μm , homogéneamente distribuidas. Las células CR+ se localizaron en la capa granular, por debajo de la capa de células de Purkinje (Figura 4-15). Lo más característico de estas células fue la presencia de una única dendrita, que al final de esta presenta grupos de pequeños apéndices, a modo de cepillo, que le dan su nombre característico de célula en cepillo o célula monopolar del cerebelo (Figura 4-15E y F). Sus dendritas tenían un diámetro entre 2-3 μm y una longitud media de 10-25 μm , Esta tiene un recorrido variable, que puede ser recto o curvo, y apunta con la misma frecuencia hacia la capa molecular como a la sustancia blanca o también hacia la parte lateral de la capa granular.

La inmunorreactividad a CR+ en las células en cepillo fue regular en las folias IX y X, sin embargo, esporádicamente se observaron en las otras folias. Al realizar conteo neuronal en las folias IX ($p=0.22$), y la X ($p=0.78$), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre controles e infectados (Tabla 4-11).

Figura 4-14. Efecto del virus Zika sobre la expresión de calretinina en la corteza cerebral.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica para calretinina en corteza frontal. **A.** Ratón control. Se observan neuronas CR+ dispersas en todas las capas de la corteza frontal. **B.** Ratón Infectado. A simple vista se notan más células CR+ en las capas corticales. **C.** Ampliación del control. Se marca núcleo y citoplasma de neuronas bipolares CR+. **D.** Ampliación del infectado. Nótese un número mayor de neuronas CR+ con características similares a las observadas en las muestras controles. Aumento de A y B en 10X, C y D en 40X.

Tabla 4.10. Conteo de neuronas inmunorreactivas a calretinina en la corteza frontal.

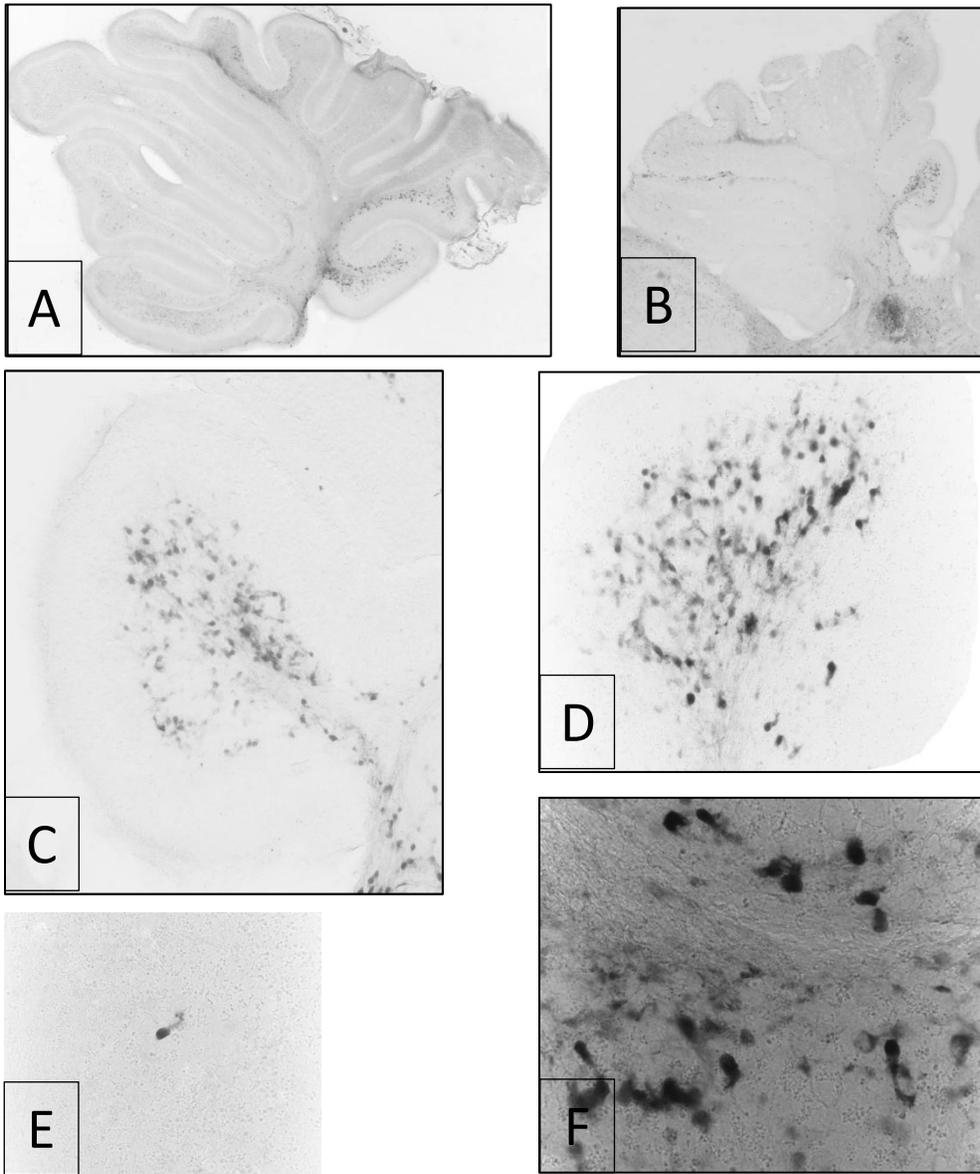
Capas/ Muestras	Controles CR+							Infectados CR+							Valor p
	1	2	3	4	5	Media	SD	1	2	3	4	5	Media	SD	
I	14	8	17	7	15	12.2	4.44	17	9	9	11	12	11.6	3.29	0.9999
II	20	14	25	25	18	20.4	4.72	48	20	20	37	19	28.8	13.1	0.4048
III	18	9	17	19	18	16.2	4.09	27	20	9	30	23	21.8	8.11	0.1111
IV	12	9	11	14	13	11.8	1.92	23	12	15	21	12	16.6	5.13	0.1508
V	22	29	34	15	38	27.6	9.24	21	75	99	38	73	61.2	31.28	0.1032
VI	4	21	8	6	2	8.2	7.50	2	21	29	8	28	18	12.10	0.2778
Totales	90	90	112	86	104	96.4	11.08	138	157	181	145	167	158	17.17	0.0079**

Por cada muestra se relacionan los promedios del conteo de células inmunorreactivas a calretinina en la corteza frontal, en cinco cortes por cada muestra de ratones controles e infectados.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Los conteos realizados en la corteza frontal arrojaron un aumento significativo de las células CR+ en los infectados, al confrontar los promedios de la sumatoria de todas las capas corticales, en los cinco casos estudiados. Sin embargo, la diferencia no fue significativa en ninguna de las capas, al realizar la estadística de forma individual en cada capa (Tabla 4-10), esto podría indicar que el aumento de las células no se presentó de forma acentuada en ninguna de las capas y a su vez el aumento es homogéneo en todas, de tal forma que la diferencia no se establece significativamente al estudiar cada capa de forma individual.

Figura 4-15. Efecto del virus Zika sobre la expresión de calretinina en el cerebelo.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica para calretinina en cerebelo. **A.** Ratón control. Se aprecian neuronas CR+ en las folias IX y X. **B.** Ratón infectado. Nótese células CR+ distribuidas en las folias IX y X sin diferencias aparentes. **C.** Ampliación de la folia X del control. **D.** Ampliación de la Folia X del ratón infectado. No se identificaron diferencias significativas en la inmunorreactividad entre controles e infectados. **E.** Una de varias células en cepillo halladas esporádicamente a través de las folias del cerebelo. **F.** Células en cepillo de la folia IX. Aumentos de A y B en 5X, C en 10X, D en 20X, E en 40X y F en 80X.

Tabla 4.11. Conteo de neuronas inmunorreactivas a calretinina en las folias IX y X del cerebelo.

	Folias/Casos	1	2	3	4	5	Media	SD	p
Controles	IX	67	76	81	77	58	71,8	9,26	
	X	129	118	102	96	105	110	13,32	
Infectados	IX	65	86	48	45	49	58,6	17,18	0,2222
	X	121	106	102	105	109	108,6	7,37	0,7857

Por cada muestra se relacionan los promedios del conteo de células inmunorreactivas a calretinina en las folias IX y X del cerebelo de ratones controles e infectados.

Diferencias no significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

4.7. Distribución de la inmunorreactividad a S-100 β y efecto de la infección con el virus Zika.

En la corteza frontal de los ratones control, la inmunohistoquímica para S-100 β reveló pequeñas y abundantes células distribuidas por todas las capas corticales (Figura 4-16A y 4-16C). En los ratones infectados se observó mayor densidad poblacional de células S-100 β + y, a simple vista, más intensamente teñidas, en comparación con las muestras control (Figura 4-16A y 4-16B). Con el conteo celular se halló aumento estadísticamente significativo ($p=0,0079$) en el número de células inmunorreactivas a S-100 β en las muestras infectadas, con un promedio total de 1166 células en comparación con los controles con un promedio de 805 células en un área de 1mm² (Tabla 4-12).

En el cerebelo se presentaron abundantes células S-100 β + distribuidas a través de todas las folias. En la capa granular se identificaron pequeñas células con morfología característica de astrocitos (Figura 4-17). En la capa molecular se identificaron células con morfología característica de la glía de Bergmann, con cuerpos celulares intensamente teñidos, al lado de las células de Purkinje. De cada uno de ellos se desprenden procesos celulares paralelos en dirección a la piamadre. Adicionalmente el área de los núcleos profundos también exhibió inmunorreactividad notoria a la S-100 β (Figura 4-17).

Figura 4-16. Efecto del virus Zika sobre la expresión de S-100 β en la corteza cerebral.

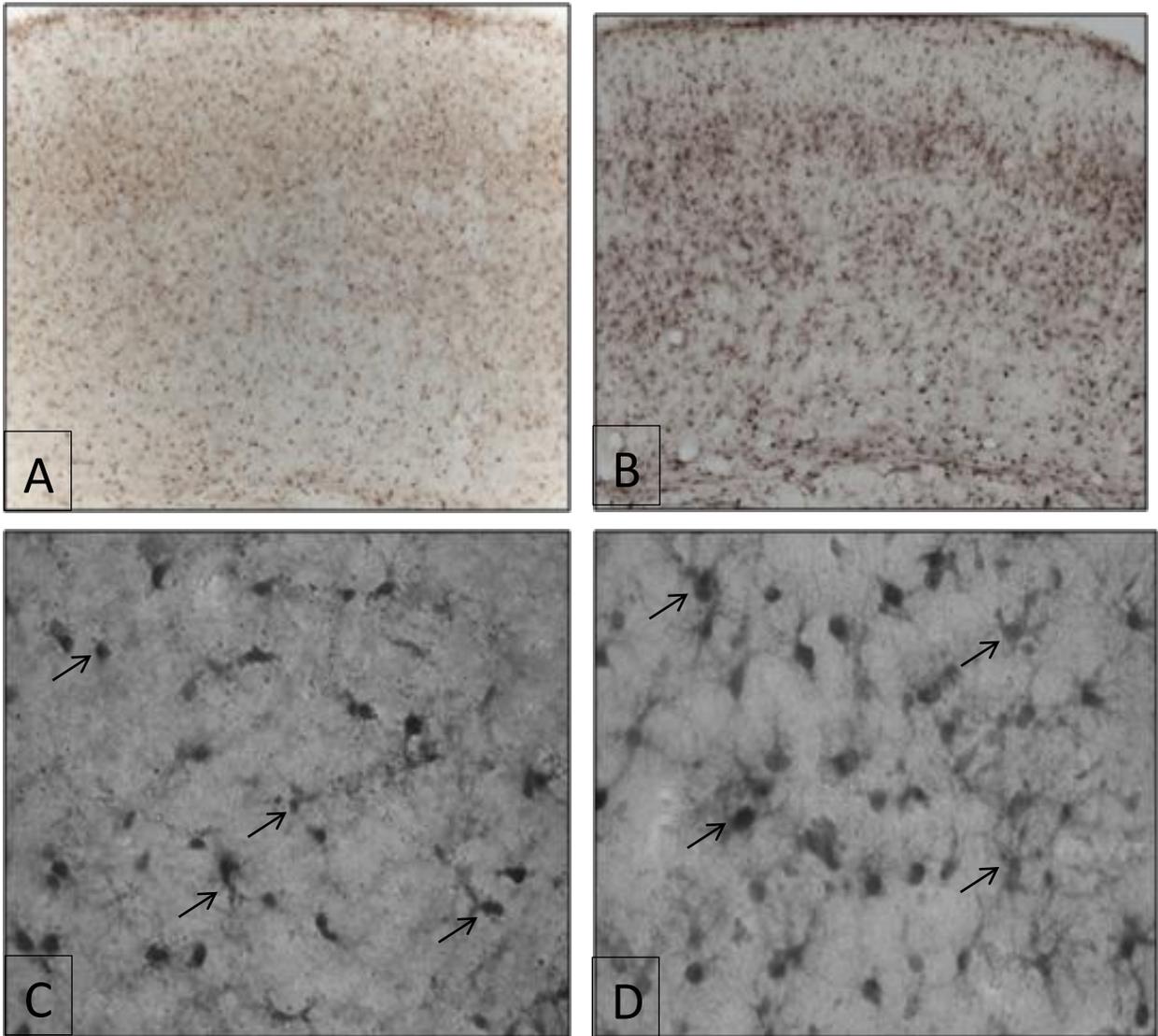


Imagen panorámica de la inmunohistoquímica de S-100 β en la corteza cerebral. **A.** Ratón control. Nótese células S-100 β + en todas las capas de la corteza frontal. **B.** Ratón Infectado. A simple vista se observa mayor inmunotinción de la S-100 β . **C.** Ampliación del control. Se observan pequeños somas con diámetros de entre 4 y 5 μ m con algunos procesos celulares. **D.** Ampliación del infectado. Se evidencia aumento en el número de células S-100 β +. Además, mayor tamaño de las células (flechas), hasta de 6,5 μ m de diámetro y procesos celulares más robustos. Aumentos de A y B en 10X, C y D en 40X.

Tabla 4.12. Conteo de neuronas inmunorreactivas a S-100 β en la corteza frontal.

Capas/ Muestras	Controles S-100 β							Infectados S-100 β							Valor p
	1	2	3	4	5	Media	SD	1	2	3	4	5	Media	SD	
I	104	108	107	101	106	105.2	2.77	109	127	107	114	116	114.6	7.83	0.023**
II	71	67	80	74	78,5	74.1	5.34	99	115	102	95	99	102	7.68	0.0079*
III	63	58	65	59	60	61	2.92	110	114	113	103	108	109.6	4.39	0.0079*
IV	69	55	57	56	54	58.2	6.14	92	90	121	103	111	103	13.01	0.0079*
V	294	189	267	227	224	240.2	40.84	368	342	453	366	376	381	42.20	0.0079*
VI	282	231	273	263	286	267	21.99	396	310	396	320	356	355.6	40.65	0.0079*
Totales	883	708	849	780	809	805,8	67.21	1174	1098	1292	1101	1166	1166,6	78.72	0.0079*

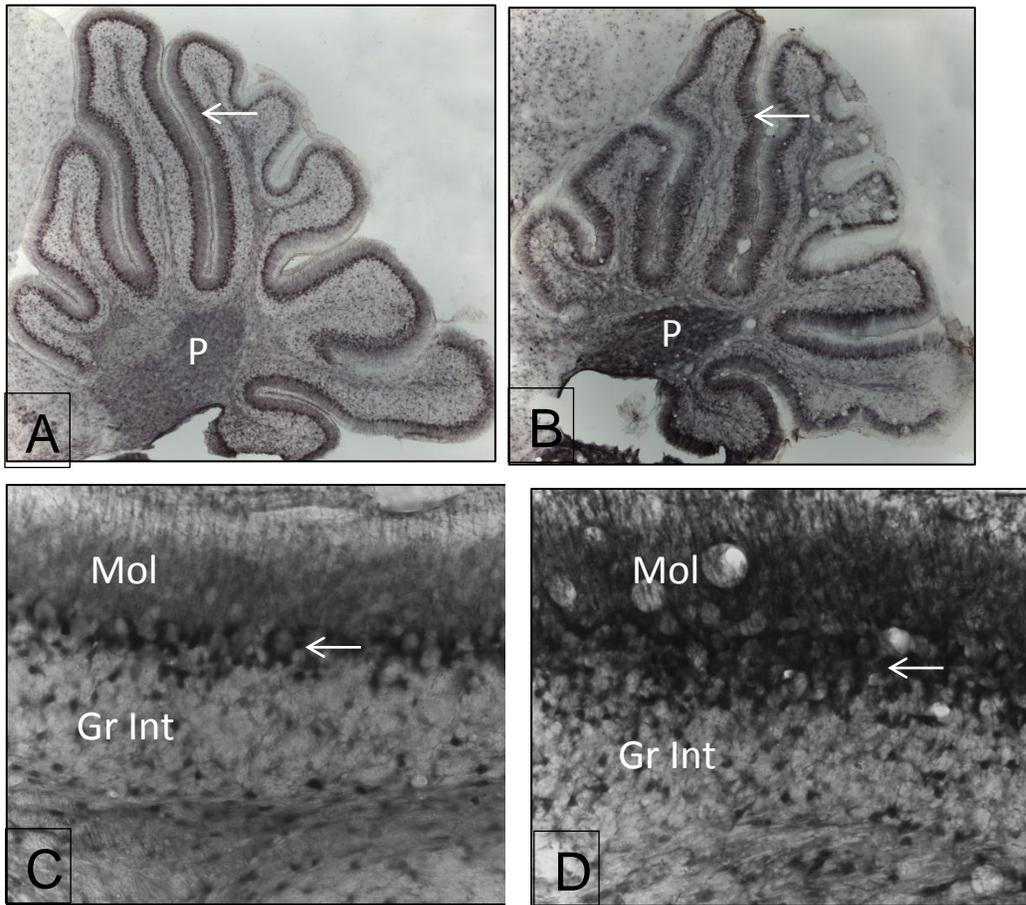
Se relacionan los promedios de cinco cortes por muestra del conteo de células inmunorreactivas a S-100 β en 1mm² de corteza frontal de controles e infectados.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

En los cerebelos infectados se afectó la expresión de la proteína S-100 β . A simple vista se notó falta de homogeneidad en la inmunoreactividad a través de la diez folias. Debido a esto se realizó densitometría de la capa molecular y conteo celular de 3 campos de 0,5 mm² en la capa granular de cada una de las folias. La densitometría de la capa molecular reveló aumento estadísticamente significativo en las folias III (p=0,0079), IV-V (p=0,0159), VI (p=0,0079) y X (p=0,0079) y disminución de la inmunotinción en las folias VII (p=0,0317), VIII (p=0,0079) y IX (p=0,0079). En la folia I-II no se encontraron diferencias significativas (Tabla 4-13).

Los conteos celulares realizados en la capa granular, evidenciaron igual que la densitometría, resultados variados en las folias del cerebelo. Se encontró aumento significativo en la folia IV-V (p=0.0238) y disminución significativa en las folias VII (p=0.0079) y VIII (p=0.0079), sin embargo en las demás folias I-II, III, VI, IX y X no se presentaron diferencias significativas en el número de células reactivas a S-100, al realizar la estadística entre promedios generales incluyendo todas las folias, la diferencia no fue significativa (p=0,2381) (Tabla 4-14). En los núcleos profundos fue evidente el incremento en la inmunoreactividad a S-100 β en los infectados, aunque no se hizo la medición densitométrica correspondiente. (Figura 4-17).

Figura 4-17. Efecto del virus Zika sobre la expresión de S-100 β en el cerebelo.



Imágenes panorámicas de la inmunohistoquímica para S-100 β en cerebelo. **A.** Ratón control. Es notoria la inmunorreactividad en la capa molecular (flecha) determinada por la glía de Bergmann y en el área de los núcleos profundos (P). **B.** Ratón Infectado. Nótese el menor tamaño del cerebelo y el contorno irregular de las folias. La inmunotinción de la capa molecular (flecha) aumentó en las folias III, IV-V, VI, X y disminuyó en las folias VII, VIII y IX debido a daño tisular. En los núcleos profundos (P) es evidente el aumento en la inmunorreactividad de la S-100 β . **C.** Ampliación del control. Se observan los cuerpos celulares de la glía de Bergmann (flecha en la zona de las células de Purkinje) y sus procesos en la capa molecular (Mol). En la capa granular interna (Gr Int) se distribuyen pequeñas y abundantes células S-100 β + del tipo astrocito. **D.** Ampliación del infectado. Se observa un segmento de las folias IV-V con mayor inmunorreactividad en la glía de Bergmann en la capa molecular (Mol) y mayor número de células positivas en la capa granular (Gr Int). Aumentos de A y B en 10X, C y D en 40X.

Tabla 4.13. Densitometría de S-100 β en la capa molecular del cerebelo de ratones

Densitometría de la inmunorreactividad a S-100β en la capa molecular del cerebelo de controles									
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)									
Muestras/	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	totales
Folias									
1	70,511	78,219	69,869	86,235	98,529	102,409	72,582	75,235	81,699
2	59,307	64,864	62,481	92,787	78,524	89,402	79,425	69,478	74,534
3	112,967	125,422	97,429	75,321	75,258	92,120	91,441	102,409	96,546
4	81,155	84,325	68,542	80,502	80,24	98,158	75,348	76,201	80,559
5	99,209	84,405	106,409	87,268	87,669	109,499,	82,529	82,896	92,486
Media	84,629	87,447	80,946	84,422	84,044	98,32	80,27	81,2438	85,16
SD	21,61	22,67	19,61	6,70	9,29	8,06	7,31	12,75	9,07

Densitometría de la inmunorreactividad a S-100 en la capa molecular del cerebelo de infectados									
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)									
Muestras/	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	totales
Folias									
1	76,371	62,428	68,429	51,265	145,529	145,122	185,429	62,212	99,598
2	45,26	35,709	47,529	42,528	152,205	132,415	125,457	32,209	76,664
3	62,645	51,402	58,263	50,178	106,428	149,523	136,965	59,486	84,361
4	62,354	56,789	52,304	50,219	80,856	120,405	189,524	58,429	83,860
5	34,541	33,158	36,213	36,204	104,602	184,329	145,822	45,845	77,589
Media	56,234	47,897	52,547	46,078	117,924	146,36	156,64	51,64	84,41
SD	16,39	12,93	12,01	6,54	30,09	24,09	29,10	12,56	9,19
Valor p	0,0952	0,0079**	0,0159**	0,0079**	0,0317**	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,9999

Por cada muestra se relaciona la densitometría de la capa molecular del cerebelo de cinco muestras y cinco cortes por muestras de ratones controles e infectados con Zika.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Tabla 4.14. Conteo de células inmunorreactivas a S-100 β en capa granular del cerebelo

Conteo de células S-100+ en la capa granular del cerebelo de ratones controles

Muestras/Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	Total células
1	34	38	48	54	53	45	39	35	346
2	61	39	53	46	49	42	47	33	370
3	38	32	49	48	55	43	44	36	345
4	36	35	45	42	49	46	41	45	339
5	65	45	42	41	58	51	54	40	396
Media	46,8	37,8	47,4	46,2	52,8	45,4	45	37,8	359,2
SD	14,92	4,87	4,16	5,22	3,90	3,51	5,87	4,76	23,74

Conteo de células S-100+ en la capa granular del cerebelo de ratones infectados

Muestras/ Folias	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X	Total células
1	60	58	66	45	28	32	42	49	380
2	88	69	72	62	33	25	65	32	446
3	49	54	81	45	29	34	46	45	383
4	43	56	49	52	35	28	41	35	339
5	76	68	66	68	34	39	39	42	432
Media	63,2	61	66,8	54,4	31,8	31,6	46,6	40,6	396
SD	18,70	7,00	11,69	10,31	3,11	5,41	10,60	7,02	43,21

Valor p 0.22 0,0079 0,0238** 0,2857 0,0079** 0,0079** 0,9841 0,6905 0,2381

Se relaciona el promedio del conteo de tres campos de 0,5 mm² de la capa granular de cada una de folias del cerebelo de cinco cortes por cada muestra de ratones controles e infectados.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

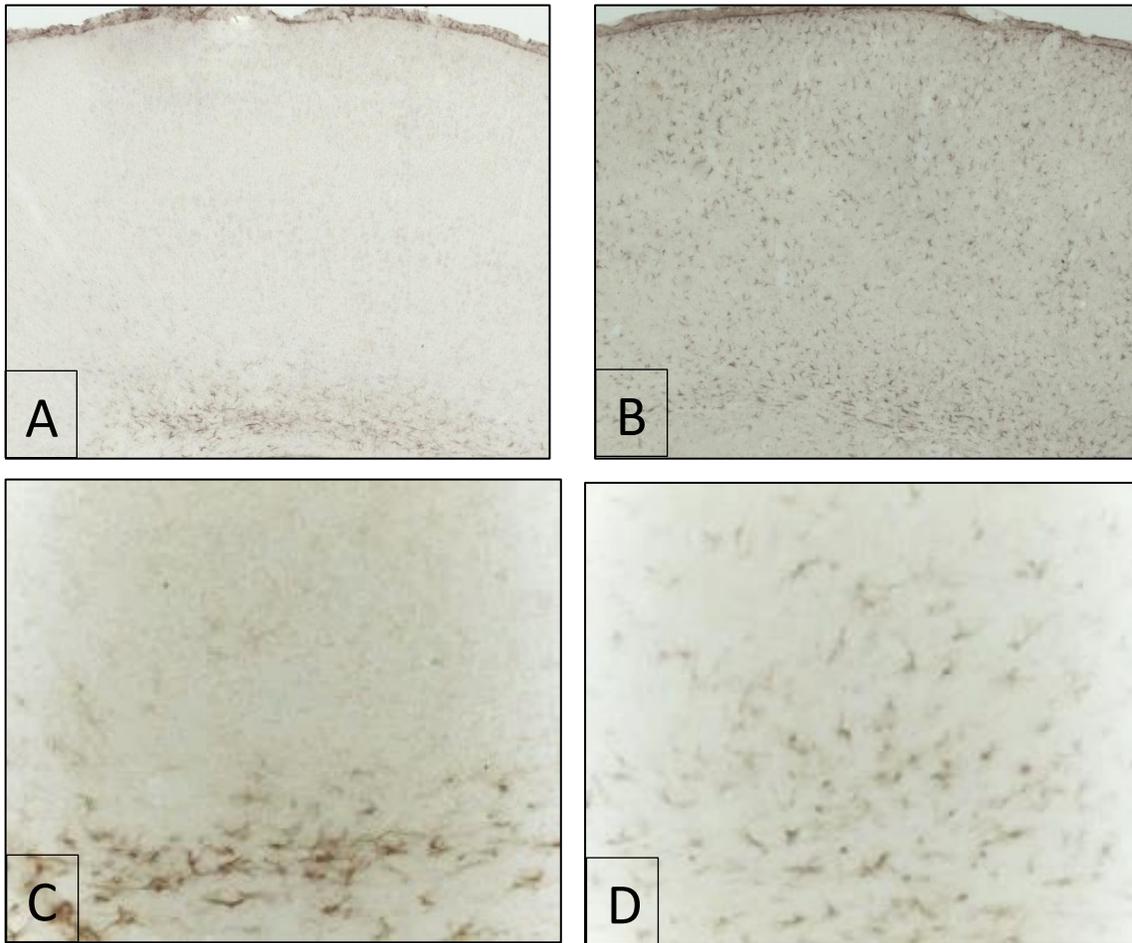
4.8. Distribución de la inmunorreactividad de GFAP y efecto de la infección con el virus Zika.

En la corteza frontal del ratón control se distinguieron por su tamaño y forma, células de tipo astrogliar localizadas en la capa VI arriba del cuerpo calloso (Figura 4-18A y C). En las muestras infectadas se hallaron abundantes cuerpos celulares dispersos en todas las capas corticales, exhibiendo a simple vista un aumento en el número de células inmunorreactivas a GFAP (Figura 4-18B y D). En los conteos se encontró un promedio general de células GFAP+ en la corteza frontal de los controles de 54,8 mientras que el número promedio de células inmunorreactivas a GFAP en la corteza frontal de los infectados fue de 628,2; por lo tanto, el aumento fue estadísticamente significativo ($p=0.0079$) (Tabla 4-15).

En los cortes de cerebelo de los ratones control, procesados para GFAP, se presentó una escasa marcación en la capa granular y abundantes procesos paralelos en la capa molecular, originados en los cuerpos celulares de la glía de Bergmann, que ocupan la zona de las células de Purkinje (Figura 4-19A y C). La inmunorreactividad en los infectados a simple vista fue mucho más intensa que en los controles (Figura 4-19B y D). Esto se confirmó mediante densitometría en la capa molecular, arrojando un aumento estadísticamente significativo ($p=0.0079$) en inmunorreactividad a GFAP determinada por la presencia de la glía de Bergmann en todas las folias del cerebelo (Tabla 4-16).

Las células GFAP+ de la capa granular de los cerebelos infectados fueron claramente de mayor tamaño y más fuertemente teñidas en comparación con las muestras controles. Es importante resaltar que los infectados exhibieron daño tisular, caracterizado por vasodilatación y rasgaduras del tejido, como ya se había evidenciado en los otros tejidos infectados procesados para H&E y los otros marcadores. Sin embargo, en el caso de GFAP no se afectó tanto la inmunotinción por causa del daño tisular y aun pese al daño del tejido el aumento fue significativo en todas las folias, incluso las folias VI, VII y VIII, que han sido las más afectadas por la formación de calcificaciones. En conclusión, la inmunohistoquímica para GFAP permitió caracterizar reacción astrogliar tanto en la corteza cerebral como en el cerebelo, por efecto del virus Zika.

Figura 4-18. Efecto del virus Zika en la expresión de GFAP en la corteza frontal.



Imágenes de la inmunohistoquímica para GFAP en la corteza frontal de ratones. **A.** Ratón control. Nótese que la marcación se presentó solamente en células de la capa VI. **B.** Ratón infectado. Se exhiben células inmunorreactivas dispersas uniformemente por todas las capas de la corteza frontal. **C.** Ampliación del control. Se observan en detalle las células GFAP+ en la capa VI. **D.** Ampliación del infectado. Es evidente la mayor cantidad de células reactivas a GFAP con sus procesos celulares y amplia distribución en toda la corteza cerebral. Aumentos de A y B en 10X, C y D en 40X.

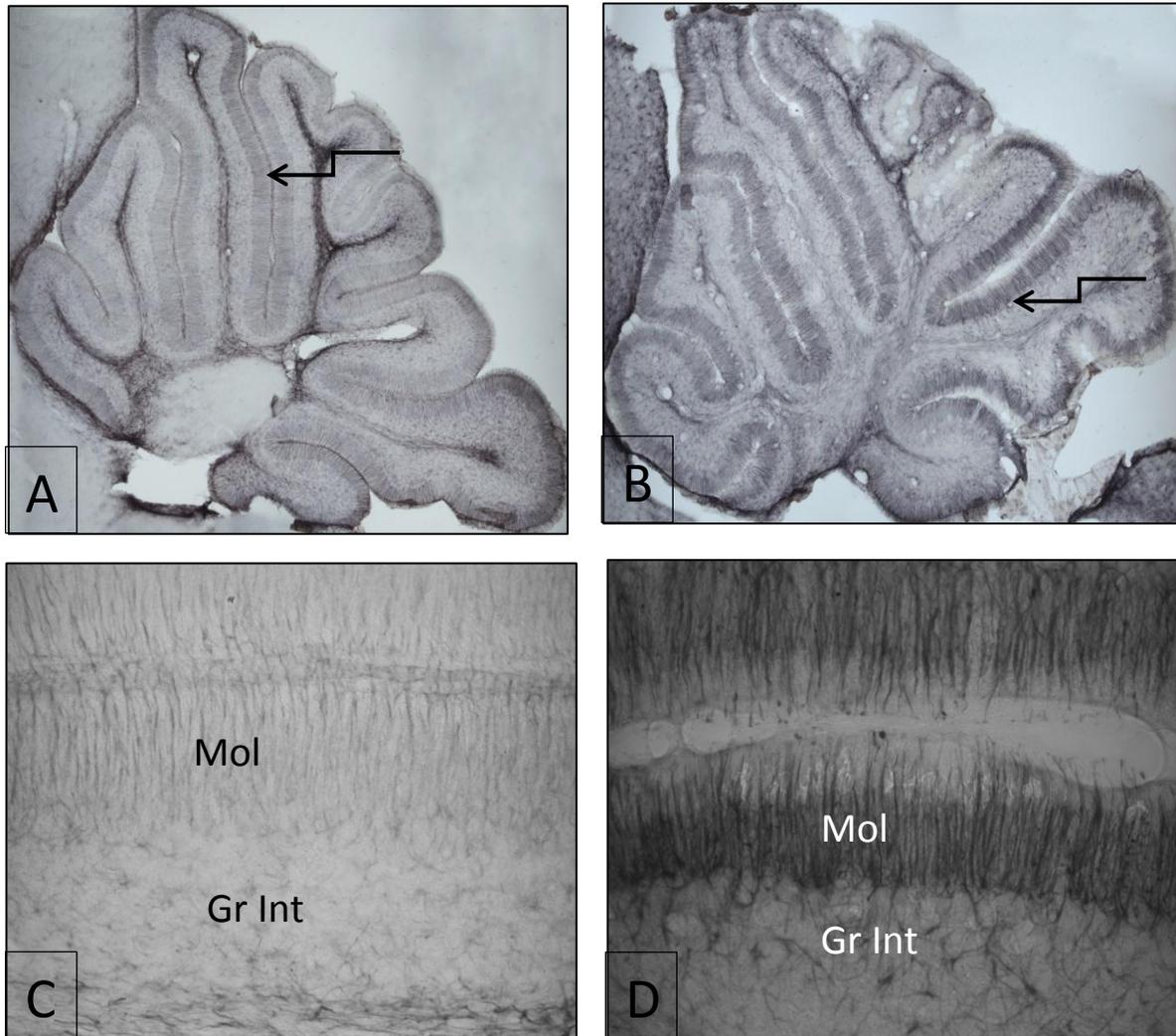
Tabla 4.15. Promedio del conteo de células inmunorreactivas a GFAP en la corteza cerebral de cinco muestras, evaluando cinco cortes por cada muestra.

Promedio células inmunorreactivas a GFAP en la corteza cerebral		
Muestras	Controles	Infectados
1	52	739
2	62	568
3	55	685
4	48	520
5	57	629
Promedio	54,8	628,2
P= 0.0079**	SD 5,26	SD 87,80

Se relaciona el conteo de células inmunorreactivas a GFAP en muestras de la corteza cerebral frontal de cinco ratones controles e infectados y cinco cortes por cada muestra en un campo de 1mm².

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Figura 4-19. Efecto del virus Zika en la expresión de GFAP en el cerebelo de ratón.



Imágenes de la inmunohistoquímica para GFAP en cerebelo. **A.** Ratón control. Se observa inmunotinción homogénea en la capa molecular (flecha). **B.** Ratón infectado. Nótese el aumento de la inmunorreactividad en la capa molecular (flecha). **C.** Ampliación del control. Detalle capa molecular de la folia VI. Se distinguen con baja inmunorreactividad los procesos de la glía de Bergmann (Mol) en dirección a la piamadre y escasa marcación en la capa granular interna (Gr Int). **D.** Ampliación del infectado. Es notorio el aumento de la inmunotinción en la capa molecular y granular. Se demarcan muy bien los procesos de la glía de Bergmann. Aumentos de A y B en 10X, C y D en 40X.

Tabla 4.16. Promedios de la densitometría de la capa molecular del cerebelo en muestras procesadas por inmunohistoquímica para GFAP.

Densitometría de la inmunorreactividad a GFAP en la capa molecular del cerebelo de controles								
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)								
Muestras	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X
/Folias								
1	168,869	161,292	161,269	159,871	158,681	156,247	169,412	170,452
2	158,020	155,998	156,523	149,105	149,641	162,429	149,456	148,485
3	138,214	168,421	149,479	169,230	154,721	148,219	147,836	182,654
4	158,657	144,449	155,562	162,265	152,429	155,748	156,254	163,856
5	140,631	161,749	147,530	145,895	149,258	140,987	165,297	147,927
Media	152,88	158,3818	154,07	157,27	152,95	152,73	157,65	162,674
SD	13,04	8,95	5,57	9,63	3,9	8,27	9,52	14,83
Densitometría de la inmunorreactividad a GFAP en la capa molecular del cerebelo de infectados								
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)								
Muestras/	I-II	III	IV-V	VI	VII	VIII	IX	X
Folias								
1	108,847	95,357	94,144	96,588	98,744	110,434	116,614	86,429
2	111,642	90,787	109,205	91,216	102,877	108,309	114,233	91,723
3	98,862	104,217	94,562	99,852	101,969	92,421	99,894	99,217
4	102,405	100,520	107,856	100,315	95,429	96,315	92,429	88,741
5	95,471	103,987	105,965	94,402	95,315	93,257	106,744	99,415
Media	103,445	98,973	102,35	96,47	98,87	100,15	105,98	93,105
SD	6,75	5,81	7,39	3,81	3,54	8,58	10,03	5,97
p	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,0079**	0,0079**

Se relaciona la densitometría de la inmunotinción a GFAP en la capa molecular del cerebelo. En cada caso se evaluaron cinco cortes.

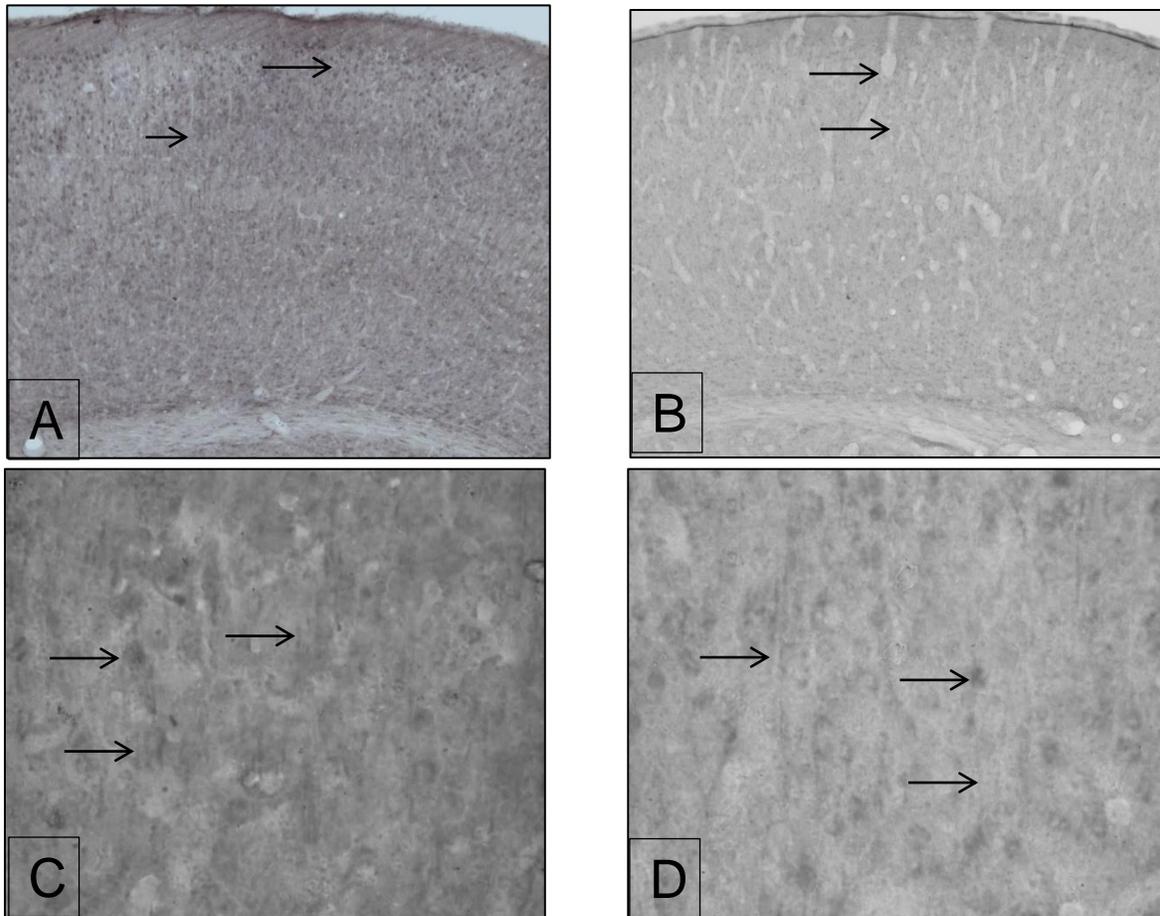
** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

4.9. Distribución de la inmunorreactividad a MAP-2 y efecto de la infección con el virus Zika.

En los controles la inmunorreactividad a MAP-2 se presentó de manera difusa en todas las capas corticales, aunque en las capas supragranulares se evidenciaron algunos puntos de mayor concentración del marcador que parecen ser células positivas, pero sin morfología bien definida, además de lo que parecen ser fragmentos cortos de dendritas en dirección a la piamadre (Figura 4-20 A y C). En los ratones infectados se observó la misma distribución del marcador, aunque la inmunorreactividad fue cualitativa y cuantitativamente menor (Figura 4-20 B y D). La evaluación densitométrica resultó en disminución estadísticamente significativa ($p=0,0079$) de la inmunorreactividad a MAP-2 en la corteza cerebral de las muestras infectadas (Tabla 4-17).

La inmunorreactividad en el cerebelo de los animales controles fue muy evidente en la capa granular y en el área de los núcleos profundos. La marcación fue difusa sin claridad en la delimitación de cuerpos celulares (Figura 4-21A). En las muestras infectadas fue notable la pérdida de inmunorreactividad en la corteza de todas las folias del cerebelo. En los núcleos profundos también hubo pérdida de inmunotinción, aunque con menor intensidad (Figura 4-21B). La densitometría medida en la corteza cerebelar de las muestras de animales infectados resultó en pérdida de inmunorreactividad estadísticamente significativa ($p=0,0079$) (Tabla 4-18).

Figura 4-20. Efecto de la infección por virus Zika en la expresión de MAP-2 en corteza cerebral de ratones.



A y C. Ratón control. Se observa inmunorreactividad difusa en todas las capas corticales con algunos unos puntos de mayor concentración de la proteína (flechas) que quizás corresponden a cuerpos neuronales y cortos fragmentos de dendritas. B y D. Ratón infectado. La distribución de la inmunorreactividad es similar a la del control, pero con menor inmunotinción que indica posible pérdida en la expresión de MAP2. Aumentos de A y B en 10X, C y D en 40X.

Tabla 4.17. Promedios de la densitometría en la corteza cerebral de muestras procesadas para inmunohistoquímica de MAP-2.

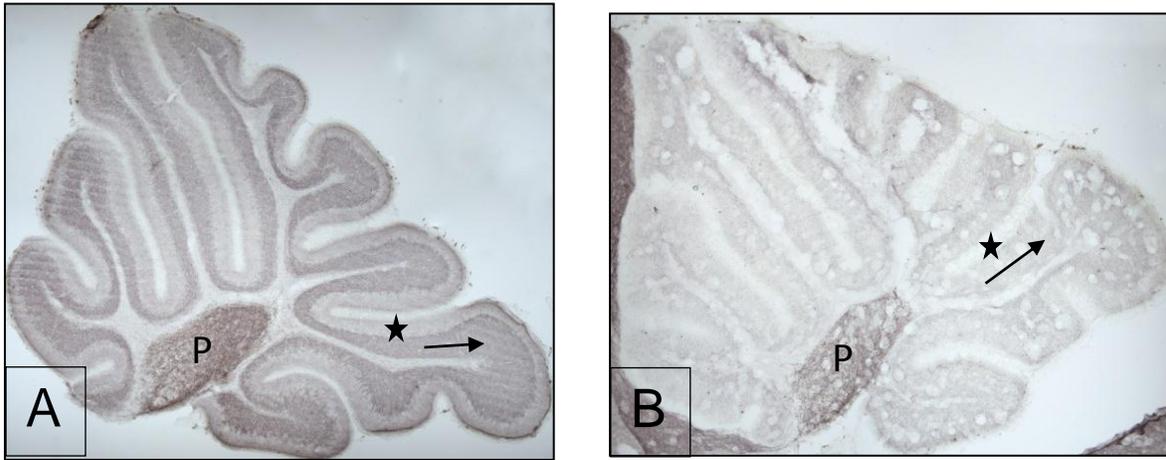
Densitometría de la expresión inmunohistoquímica de MAP-2 en la corteza cerebral		
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
Muestras	Controles	Infectados Zika
1	141,712	174,852
2	139,260	173,011
3	136,962	164,396
4	140,708	168,859
5	140,103	174,856
Promedio	139,749	171,194
Valor p = 0.0079**	SD 1,80	SD 4,52

Por cada muestra se relaciona la densitometría de la tinción de MAP-2 en la corteza cerebral de ratones controles e infectados. En cada muestra se evaluaron cinco cortes.

** Diferencia significativa. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Aunque la tinción inmunohistoquímica de MAP-2 fue muy difusa también fue muy homogénea a lo largo de las folias del cerebelo, por esto el dato obtenido por densitometría de cada uno de los cortes, se realizó seleccionando la capa molecular y granular a través de todas las folias del cerebelo, permitiendo así identificar la disminución significativa de la tinción para MAP-2, en los cerebelos infectados en comparación con las muestras controles.

Figura 4-21. Efecto del virus sobre la expresión de MAP-2 en el cerebelo.



Imágenes Panorámicas de la inmunohistoquímica para MAP-2 en cerebelo. **A.** Ratón Control. Se observa teñida de forma difusa la capa granular (flecha) y una marcación más tenue en la capa molecular (asterisco), en todo el corte se puede distinguir una mayor tinción en los núcleos profundos (P). **B.** Ratón Infectado. A simple vista se observa menos tinción en la capa granular en comparación con el control. La tinción se ve un poco más intensa en los núcleos profundos (P).

Tabla 4.18. Promedios de la densitometría del cerebelo en muestras procesadas por inmunohistoquímica de MAP-2.

Densitometría de la expresión inmunohistoquímica de MAP-2 en el cerebelo		
Valor promedio escala de luz transmitida (0-255)		
Casos	Controles	Infectados Zika
1	142,319	198,924
2	169.012	198,898
3	174,110	200,703
4	158,894	207,053
5	155,860	213,153
Promedio	160,039	203,75
Valor p = 0,0079**	SD 12,36	SD 6,23

Por cada muestra se relaciona la densitometría de la tinción de MAP-2 en el cerebelo de ratones controles e infectados. En cada caso se evaluaron cinco cortes.

** Diferencias significativas. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Debido, a que en el cerebelo la marcación de MAP-2 fue homogénea y se extendió de forma difusa en todo el espacio celular, de la capa granular a lo largo de las folias; la densitometría se realizó delimitando la capa y obteniendo un dato densitométrico por cada corte, para conseguir después un promedio de cinco cortes por cada caso y se evaluaron cinco casos. En todos los animales infectados el comportamiento de MAP-2 fue consistente en evidenciar la pérdida de la proteína.

Aunque en la corteza cerebral la pérdida de MAP-2 fue significativa, a simple vista fue más evidente la pérdida de inmunorreactividad en el cerebelo, por efecto del virus Zika. En el cerebelo la tinción de MAP-2 fue más difusa, sin permitir diferenciar claramente la estructura celular, en comparación con la corteza cerebral.

4.10. Patología dendrítica en neuronas de la corteza cerebral y el cerebelo de ratones infectados con Zika.

Se obtuvieron buenos resultados con el método de Golgi Cox para la descripción de la morfología neuronal en ratones posnatales. En la corteza cerebral y a nivel subcortical se evidenciaron células impregnadas en cortes coronales (Figura 4-22 A y B). En los controles la corteza frontal exhibió impregnación de abundantes cuerpos celulares en todas las capas, en plano rostral a nivel de la comisura anterior y más atrás a nivel del hipocampo. Los somas correspondían a diferentes tamaños y variaciones en su forma: piramidales, redondos y ovalados. También se observaron células muy pequeñas, con características de glía, principalmente en la capa I (Figura 4-22 C y E).

Se reconocieron neuronas por su tamaño y forma, de acuerdo con la edad posnatal de los ratones. Se identificaron en diferentes estadios del desarrollo de su arborización dendrítica. La mayoría de las neuronas se encontraban en la etapa en que presentan un cono de crecimiento que surge de una dendrita o un axón, conformado por un penacho con múltiples prolongaciones cortas denominadas filopodios, que también se pueden desprender directamente del soma. (Figura 4-22 I y K). Una característica común de muchas de las neuronas impregnadas fue la presencia de una dendrita apical dirigida hacia la piamadre, (Figura 4-22G y H).

Al observar en detalle los preparados de Golgi se hizo evidente que las neuronas que se encontraban entre las capas II y III de la corteza frontal, tanto en la parte anterior como posterior (Figura 4-22C y E), exhibían arborización dendrítica mucho más desarrollada, haciendo visible múltiples conexiones con neuronas cercanas. Un rasgo muy notorio fue la presencia de espinas dendríticas (Figura 4-22G), sin embargo, entre las capas IV y VI predominaron neuronas con un árbol dendrítico mucho menos desarrollado. (Figura 4-22 I y K).

En la corteza cerebral de los animales inoculados con virus Zika se observaron pocas neuronas con morfología normal y otras con cambios morfológicos notables. La infección afectó la calidad de las imágenes por cuanto hubo tendencia a la desimpregnación del tejido y, en general, el número de neuronas impregnadas fue inferior, observándose también alterado el patrón de organización celular en las capas y por lo tanto la cito

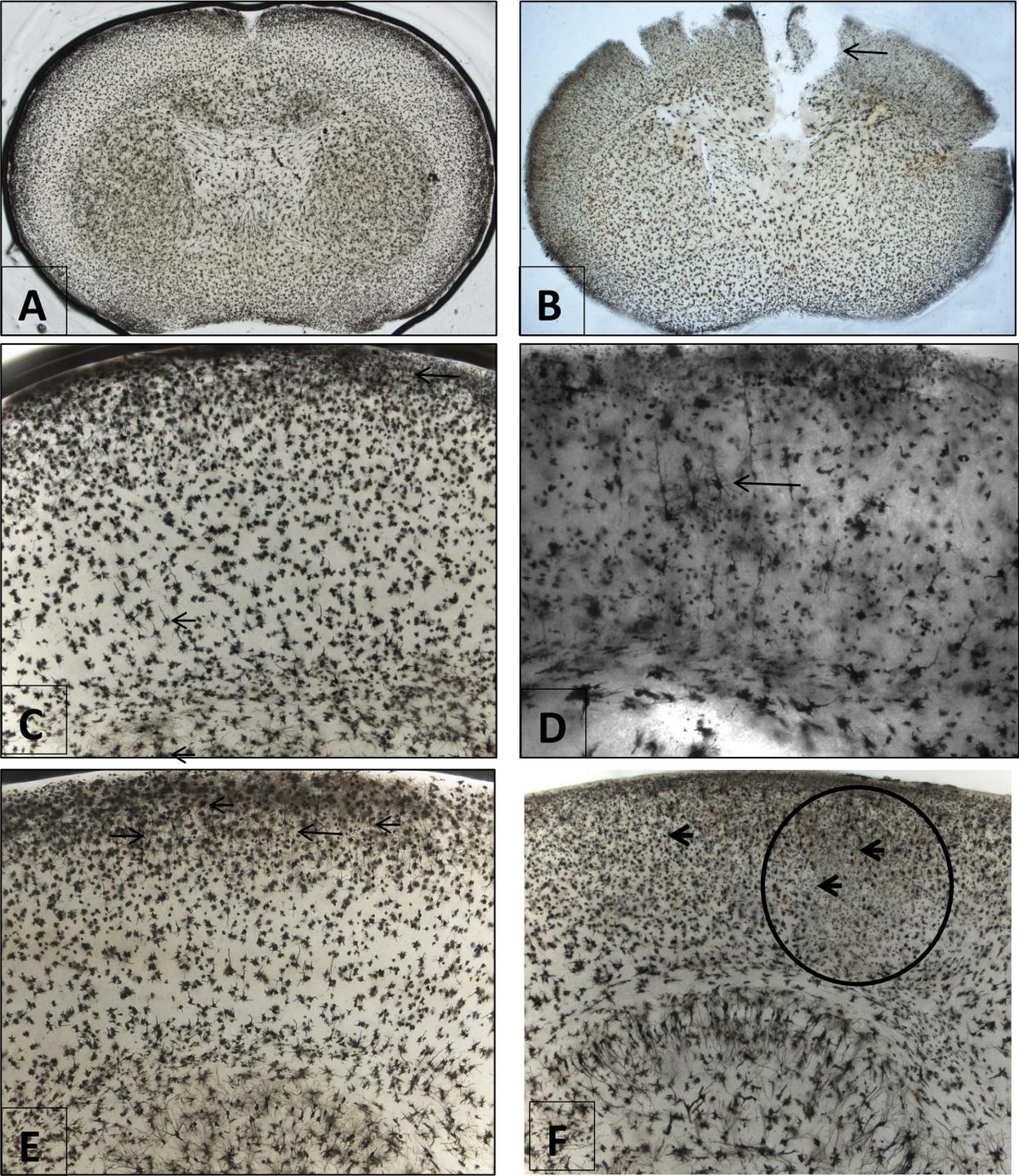
arquitectura. Un rasgo notorio en el tejido infectado fue la impregnación de abundantes y pequeños cuerpos celulares que corresponden a glía (Figura 4-22 H, J y L).

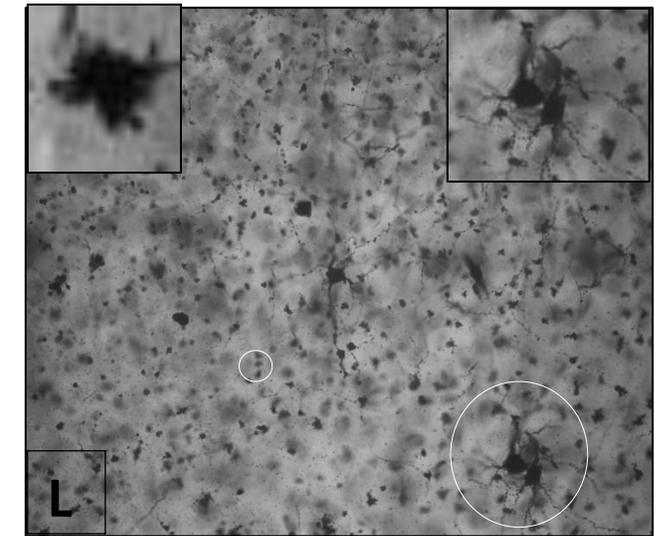
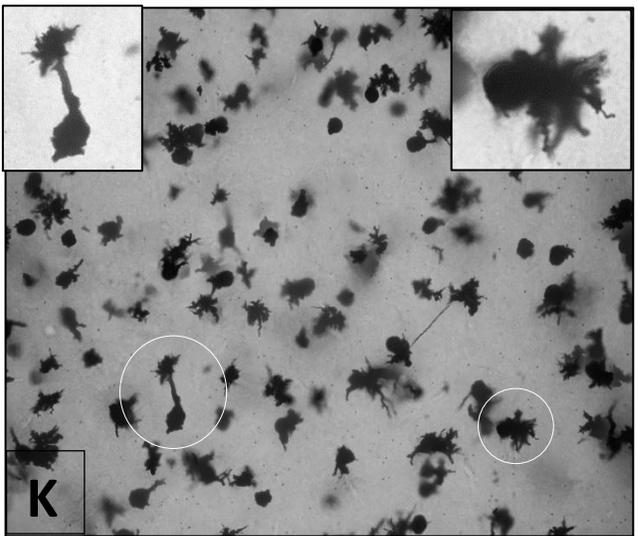
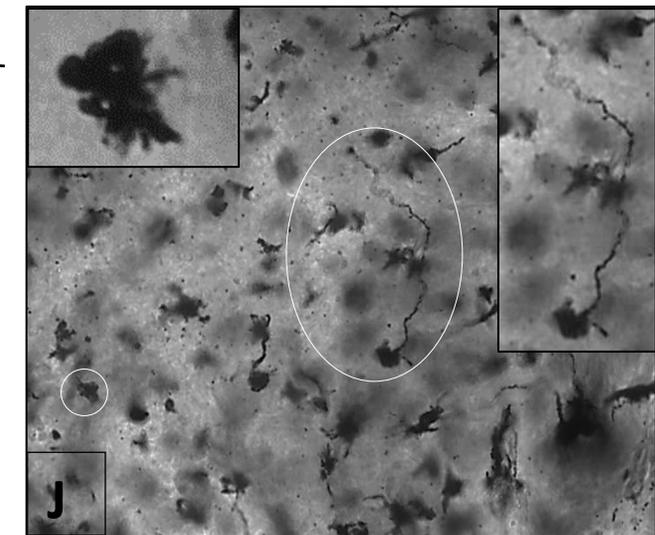
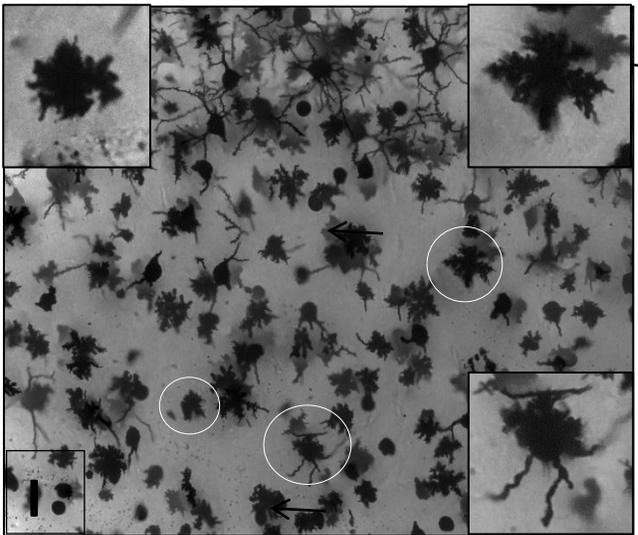
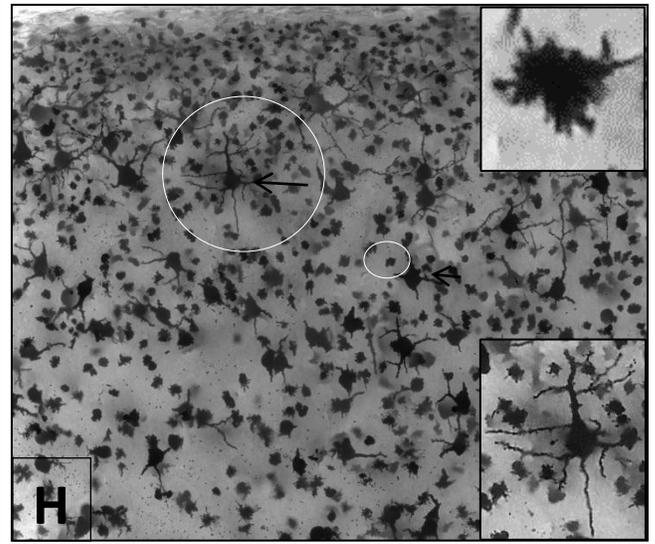
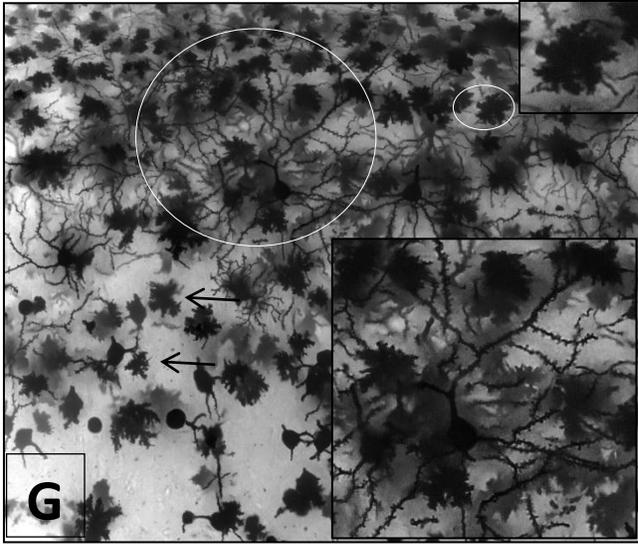
Áreas con calcificaciones se hicieron evidentes en los tejidos procesados por la técnica de Golgi, dificultando el procesamiento de los cortes, rasgando el tejido (Figura- 4-22B). Se pudo distinguir un tipo de impregnación en cortes alejados de la calcificación, en cuyas áreas se realizó el estudio de la arborización dendrítica, donde las características se hacían más semejantes a lo observado en los controles (Figura- 4-22H), aunque con alteraciones evidentes. Un rasgo característico fue la presencia de múltiples células de microglía y pocas neuronas, que se observaron con largas dendritas apicales y dendritas basales muy desarrolladas distribuidas en cualquiera de las capas corticales.

Sin embargo, al examinar la impregnación de Golgi en las áreas de la calcificación (Figura 4-22J) el daño en el tejido era evidente y en la medida en que el foco de la calcificación era más grande, las alteraciones en la morfología y en la citoarquitectura fueron más notorios con muy pocas neuronas impregnadas ya desarrolladas y ausencia casi total de neuronas en desarrollo con cono de crecimiento. La gran mayoría de cuerpos celulares impregnados corresponden a células de microglía (Figura 4-22J y L).

La técnica de Golgi permitió caracterizar neuronas en etapa de dendrogénesis y posicionamiento en las capas corticales. Estos rasgos son propios del desarrollo de la corteza cuando finaliza la migración, y las neuronas están localizando sus blancos de unión sináptica. Sólo en las capas II y III las neuronas han alcanzado un mayor grado de madurez. Todo el patrón observado en los controles se vio afectado en las muestras infectadas, donde se evidenciaron neuronas con largas dendritas apicales extendidas hacia la piamadre, poco ramificadas y muy desprovistas de dendritas basales y abundantes células gliales que por su tamaño la mayoría podrían corresponder a células de la microglía.

Figura 4-22. Tejido procesado por el Método de Golgi Cox de cerebros de ratones controles e infectados con virus Zika.





Imágenes de cortes coronales de cerebro procesados por la técnica de Golgi Cox. **A.** Ratón Control. Se observan células impregnadas en todo el corte. **B.** Ratón infectado. Es evidente menor impregnación y fragilidad del tejido, generando daño tisular (flecha). **C** y **D.** Vista de la corteza frontal a nivel de la comisura anterior. **C.** Ratón control. A simple vista se observan abundantes células impregnadas en todas las capas corticales; en la capa I se caracterizan por su tamaño y forma, abundantes células gliales de tipo astrocitario. En las capas II y III las neuronas exhiben un mayor desarrollo dendrítico. En las otras capas neuronales hubo escaso desarrollo de la arborización dendrítica. **D.** Ratón infectado. Nótese menos número de células y solo se ven unas pocas neuronas con dendritas largas poco ramificadas en cualquiera de las capas corticales. La mayoría de las células impregnadas corresponden a pequeñas células gliales y neuronas con pocas dendritas perisomáticas. **E** y **F.** Vista de la corteza frontal a nivel del hipocampo. **E.** Ratón control. La distribución de las células y su árbol dendrítico es similar a la observada en la corteza rostral. **F.** Ratón infectado. Se observa un foco localizado de deterioro en la estructura demarcada por la técnica, que podría estar asociado al desarrollo de calcificaciones (Círculo). **G** y **H.** Ampliaciones de las capas supragranulares. **G.** Ratón control. En la capa I se identifican abundantes y pequeñas células gliales de tipo astrocito (recuadro superior derecho). En las capas II y III se ven neuronas piramidales más desarrolladas, de mayor tamaño en su árbol dendrítico, con una dendrita apical dirigida hacia la piamadre y exhiben espinas dendríticas (recuadro inferior derecho). **H.** Ratón infectado. Es evidente la disminución de neuronas impregnadas en las capas II y III con evidente patología dendrítica con disminución de espinas (recuadro inferior derecho) y en general en todo el plano del corte; predominan pequeñas células gliales (recuadro superior derecho), **I, J, K, L.** Vista en detalle de neuronas en desarrollo de la corteza y de las áreas calcificadas. **I** y **K.** Ratón Control. Cuerpos celulares de las capas IV, V y VI. Se identifican células gliales de diferentes tamaños (recuadros superiores), Nótese neuronas en fase de desarrollo dendrítico (dendrogénesis); con penachos con filopodios o dendritas perisomáticas característica del cono de crecimiento (recuadro inferior derecho en **I** y recuadros superiores en **K**), **J** y **L,** Ratón infectado. Nótese la pérdida de impregnación. Se identifican pocas neuronas con dendritas apicales y basales alargadas y poco ramificadas en capas infragranulares (recuadro superior derecho), y se distinguen pocas neuronas en estadios iniciales de desarrollo dendrítico. Predominan pequeños cuerpos celulares tipo microglía (recuadro superior izquierdo. Aumentos de A y B en 5X, C, D, E, F en 20X, G, H, I, J, K, L en 40X.

Para el análisis cuantitativo de la morfología dendrítica se seleccionaron 20 neuronas de las capas II y III por cada muestra, evaluando cuatro neuronas por corte y cinco cortes por cada muestra de estudio, tanto en los animales controles como en los infectados. Cada neurona se procesó con NeuronJ del programa Image J. En los infectados se encontró una pérdida estadísticamente significativa ($p=0,041$) de la arborización dendrítica (medida en pixeles) de las neuronas de la corteza frontal. También una disminución significativa ($p=0,030$) en el área total de las neuronas estudiadas (Tabla 4-19).

Tabla 4.19. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos neuronales (somas) de la corteza frontal de ratones control e infectados con el virus del Zika, procesados por el método Golgi Cox.

Dendritas	Controles	Infectados
	Longitud en pixeles -SD	Longitud en pixeles
Apical 1^a	347; 32	249; 32
Apical 2^a	254; 39	150; 39
Apical 3^a	128; 48	126; 48
Basal 1^a	220;44	115;44
Basal 2^a	198;36	85;36
Basal 3^a	155;42	43;45
Valor p		0,041**
Área promedio en pixeles	12957	7495
Valor p área de somas		0.030**

Se relacionan los promedios en pixeles de la arborización dendrítica de ratones controles e infectados. Los promedios corresponden a cinco muestras y el análisis de 20 neuronas por cada muestra.

** Diferencias significativas.

En otras estructuras del encéfalo afectado por virus Zika, se observaron alteraciones muy notorias, similares a las de la corteza cerebral, pero en áreas como el hipocampo (Figura 4-23) y el estriado (Figura 4-24). Se seleccionaron cuatro neuronas de la capa de células piramidales del hipocampo por corte y se evaluaron cinco cortes por cada caso estudiado,

con sus respectivos controles, arrojando una disminución estadísticamente significativa ($p=0,041$) en la arborización dendrítica y el área promedio ($p=0,025$) de las neuronas del hipocampo (Tabla 4-20).

En el estriado, se escogieron al azar cuatro neuronas por cada corte y se evaluaron cinco cortes por cada muestra, con sus respectivos controles. Cuando se estudiaron las neuronas con el programa NeuronJ, se encontró disminución estadísticamente significativa ($p=0,05$) en la arborización dendrítica y el área promedio de las neuronas del estriado de los animales infectados ($p=0,045$) (Figura 4-24). (Tabla 4-21).

Figura 4-23. Hipocampo de ratones controles e infectados con virus Zika. Método de Golgi Cox

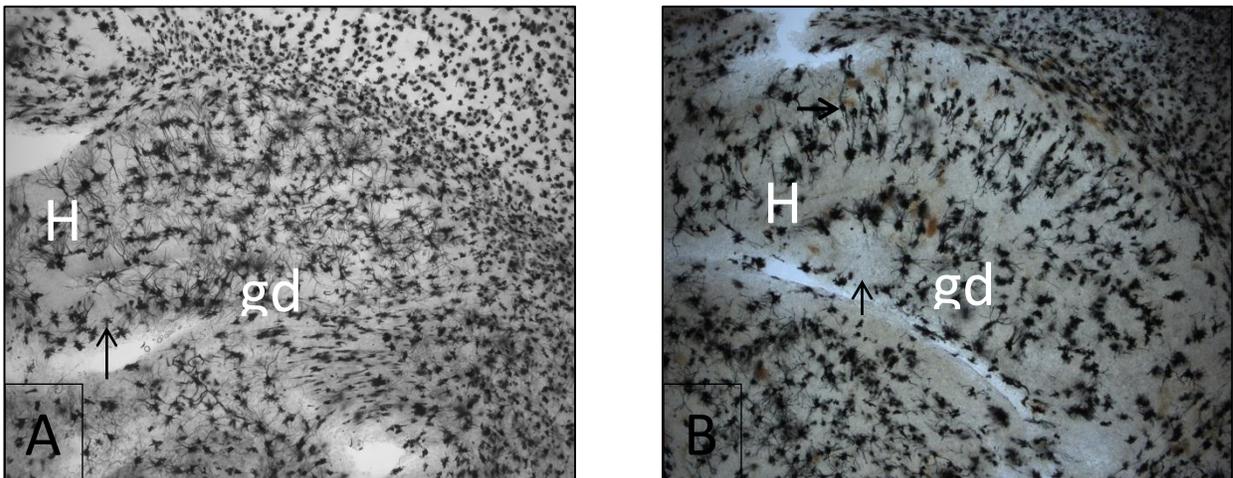


Imagen panorámica del hipocampo. **A.** Ratón control. Se observan neuronas con una amplia arborización dendrítica a lo largo de toda la capa de células piramidales y en el giro dentado (gd). **B.** Ratón infectado. A simple vista, es evidente patología dendrítica; menos arborización dendrítica en las neuronas piramidales del hipocampo y también se observa el giro dentado desprovisto de células impregnadas, exhibiendo apenas unas pocas células (gd). Aumentos en 10X.

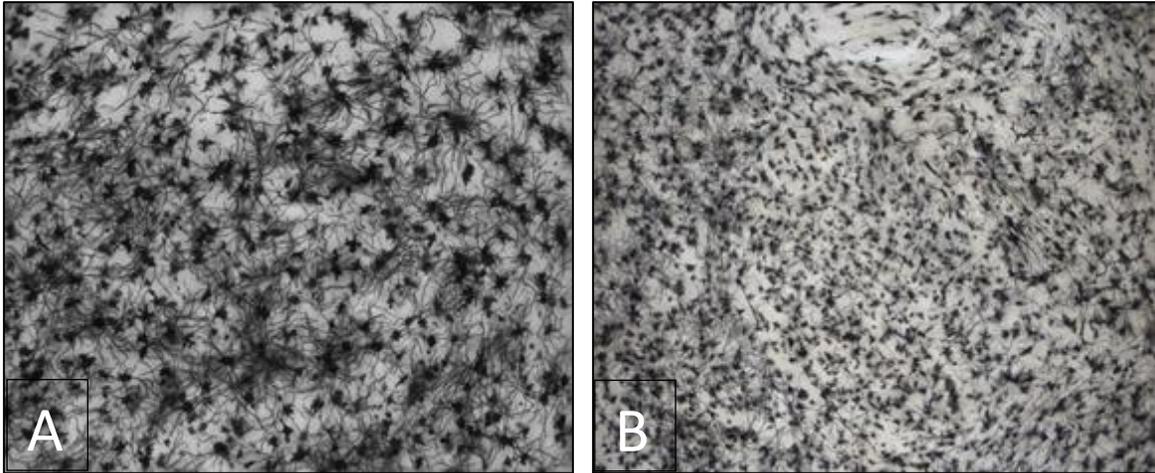
Tabla 4.20. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos neuronales (somas) de neuronas del hipocampo de ratones control e infectados con el virus del Zika.

Dendritas	Controles	Infectados
	Longitud en pixeles -SD	Longitud en pixeles
Apical 1^a	756; 38	354; 32
Apical 2^a	505; 39	254; 33
Apical 3^a	305; 48	186; 54
Basal 1^a	365; 45	45;44
Basal 2^a	259; 36	32;31
Basal 3^a	105; 42	48;57
Valor p		0.041**
Área promedio en pixeles	15742	8259
Valor p área de somas		0,025**

Se relacionan los promedios en pixeles de la arborización dendrítica de neuronas del hipocampo de ratones controles e infectados. Los promedios corresponden a cinco muestras y el análisis de 20 neuronas por cada muestra.

** Diferencias significativas.

Figura 4-24. Imágenes del estriado de ratón control e infectado con virus Zika en muestras procesadas por el método de Golgi Cox.



A. Ratón Control. Se observan abundantes procesos de neuronas estrelladas del estriado.
B. Ratón infectado. Se aprecia a simple vista disminución en la arborización dendrítica de neuronas del estriado (menos neuropilo impregnado), predominan células pequeñas sin procesos neuronales. Aumento en 10X.

Tabla 4.21. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos (somas) de neuronas del estriado de ratones control e infectados con virus Zika.

Dendritas	Controles	Infectados
	Longitud en pixeles -SD	Longitud en pixeles
Apical 1 ^a	743; 42	398; 52
Apical 2 ^a	548; 39	175; 47
Apical 3 ^a	315; 41	122; 68
Basal 1 ^a	465; 34	105;52
Valor p		0.05**
Área promedio en pixeles	19250	9626
Valor p área de somas		0.045**

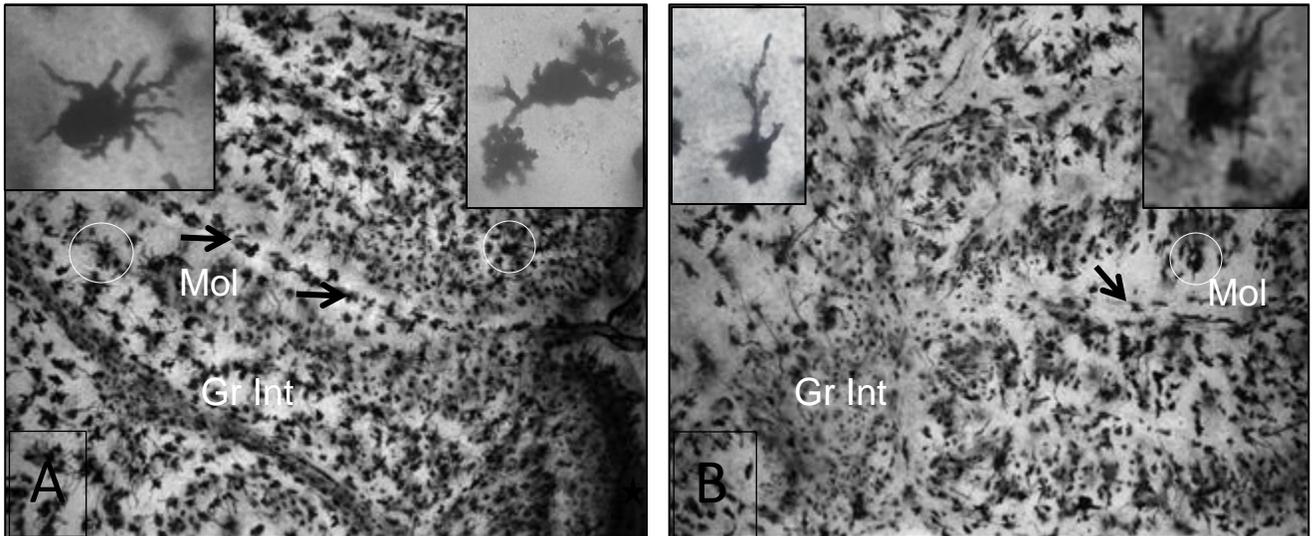
Se relacionan los promedios en pixeles de la arborización dendrítica de neuronas del estriado de ratones controles e infectados. Los promedios corresponden a cinco muestras y el análisis de 20 neuronas por cada muestra. ** Diferencias significativas.

En el cerebelo de los animales controles se pudieron distinguir las capas de la corteza en desarrollo, caracterizado por la presencia de neuronas con procesos celulares poco desarrollados, denominados conos de crecimiento. Se impregnaron pequeñas células alineadas, con escasos procesos conformando la capa granular externa. En la capa molecular se presentaron pocas células con procesos de locación dispersa. Las neuronas de Purkinje se identificaron por su localización, tamaño, y su arborización detrítica propia de la fase posnatal de las muestras. Por debajo de las células de Purkinje se reconocieron por su localización células granulares; estas también presentaron procesos en estadios iniciales del desarrollo de su árbol dendrítico (Figura-4-25A).

En los cortes de material infectado con virus Zika se observaron muy pocas células con morfología normal y neuronas con cambios morfológicos notables, estos fueron: disminución de procesos celulares, hasta el punto de encontrarse una mayoría de células que no exhiben arborización dendrítica. Se observa muy alterada la citoarquitectura neuronal en todas las capas. Las células se encuentran dispersas sin mantener un patrón de distribución homogénea. Las células de la capa granular externa son escasas y sobre la capa molecular se demarcan en algunas partes varias células dispersas y otras áreas desprovistas de células. Se identificaron por su tamaño pocas células de Purkinje, con una disminución evidente en su árbol dendrítico. En la capa granular se demarcan pequeños y abundantes cuerpos celulares sin procesos, con una evidente morfología alterada. En otras células se distingue claramente la morfología de astrocito. En general el árbol dendrítico se vio disminuido en todos los cortes de las muestras infectadas, siendo evidentes muy pocas dendritas perisomáticas y conos de crecimiento (Figura 4-25B). La impregnación de Golgi se afectó por la infección, generándose daño tisular, haciendo más difusa la marcación.

Se seleccionaron al azar 20 neuronas con características de célula de Purkinje en cinco cortes por cada muestra y se realizó procesamiento con el programa NeuronJ, identificando en los infectados una disminución estadísticamente significativa ($p=0,0079$) en la arborización dendrítica de células del cerebelo por efecto del virus Zika (Tabla 4-22).

Figura 4-25. Cerebelo de ratón control e infectado con virus Zika. Técnica de Golgi Cox.



Cortes de cerebelo procesados el método Golgi Cox y efecto del virus del Zika en ratones posnatales. **A.** Ratón control. Entre las folias se nota la presencia de células correspondientes a la capa granular externa (flecha), capa molecular (Mol), célula de Purkinje (recuadros superiores) y capa granular interna (Gr Int). **B.** Ratón infectado. Se pueden identificar las capas de la corteza del cerebelo, con un patrón de distribución alterado, y con evidente patología dendrítica en las células de Purkinje (recuadros superiores). Ampliaciones en 20X.

Tabla 4.22. Cuantificación (NeuronJ) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos (somas) de neuronas del cerebelo de ratones control e infectados con el virus del Zika.

Dendritas	Controles	Infectados
	Longitud en pixeles -SD	Longitud en pixeles
Apical 1^a	395; 56	254; 32
Apical 2^a	194; 43	104; 39
Apical 3^a	120; 53	30; 48
Basal 1^a	59;41	25;44
Basal 2^a	42	38;36
Valor p		0,0079**
Área promedio en pixeles	10459	5912
Valor p área de somas		0,0079**

Se relacionan los promedios en pixeles de la arborización dendrítica de neuronas del cerebelo de ratones controles e infectados. Los promedios corresponden a cinco muestras y el análisis de 20 neuronas por cada caso.

** Diferencias significativas.

En el cerebelo de los animales infectados se afectó la impregnación, generando la marcación de estructuras celulares desprovistas de procesos y con pequeños cuerpos celulares que podrían ser células de la microglía. Las neuronas estudiadas se seleccionaron en áreas del cerebelo más alejadas del daño tisular ocasionado por la calcificación, mientras que las áreas circundantes al daño celular exhibían alteraciones en la forma y la estructura del tejido.

5. DISCUSION.

5.1. Modelo animal desarrollado para estudiar la infección por virus Zika

Con este trabajo se ha contribuido a consolidar la utilidad del modelo animal desarrollado en el contexto del macroproyecto del cual forma parte este estudio. Ratones Balb/c de aproximadamente 24 horas de nacidos se inocularon con una cepa de virus Zika aislada de un paciente colombiano y los animales manifestaron signos neurológicos. La presencia de transcritos y antígenos virales en diferentes áreas encefálicas del modelo se confirmó mediante PCR e inmunohistoquímica (10,11,144). Aquí se ha demostrado el efecto diferencial de esta infección viral en la integridad del tejido nervioso y en la citoarquitectura de diferentes poblaciones neuronales y gliales identificadas utilizando marcadores moleculares evaluados mediante inmunohistoquímica. Este modelo además de ser específico para la investigación del efecto del Zika en el neurodesarrollo tiene la ventaja de haber sido obtenido con animales inmunocompetentes. Los resultados obtenidos en los experimentos se aproximan más a los efectos derivados de la infección natural. Esto se debe destacar porque hasta ahora la mayoría de los modelos animales reportados han utilizado ratones transgénicos o inmunosuprimidos, los cuales, además, resultan más costosos en su producción y condiciones de mantenimiento (8,9).

Por otra parte, la investigación en Zika se ha enfocado principalmente en descifrar los mecanismos neuropatológicos que generan la microcefalia y otros desórdenes neurológicos que se presentan cuando la infección en humanos ocurre en el primer trimestre de gestación. Puesto que el neurodesarrollo en ratones neonatos es equivalente al del segundo trimestre en humanos (108), nuestro modelo contribuye en aportar al conocimiento de los efectos del Zika en fases avanzadas de la gestación humana cuando la infección ya no produce microcefalia, pero sí otros efectos neurológicos que se manifiestan meses o años después del nacimiento y que apenas se están conociendo en infantes humanos debido que se trata de una enfermedad con apenas cinco años de historia clínica (51,52).

5.2. Efecto de la infección con virus del Zika en el tejido encefálico de ratón

La histología básica llevada a cabo con la técnica convencional de H&E evidenció alteraciones en la citoarquitectura neuronal tanto en la corteza cerebral como en el cerebelo. El efecto fue más notorio en el cerebelo debido a que el inicio de su neurodesarrollo es posterior al de la corteza. Un ratón al nacer ya no posee células neurales progenitoras en la corteza cerebral (61), mientras que el cerebelo conserva su capa granular externa compuesta esencialmente por células progenitoras. Estas células migran para formar la capa granular interna y dar origen a las interneuronas de la capa molecular de la corteza cerebelar (61, 85,148). La presencia de células progenitoras en el cerebelo postnatal lo hacen más susceptible a la infección por Zika.

Por otra parte, de acuerdo con un estudio realizado en cerebros humanos desde la fase de gestación hasta los 14 años, las calcificaciones en el encéfalo en desarrollo se presentan cuando el tejido sufre necrosis debido a isquemia o infecciones que dañan la integridad de la membrana celular facilitando el ingreso descontrolado de calcio. La calcificación de los tejidos necróticos es frecuente en el cerebro inmaduro, pero se considera un evento secundario a la patología primaria (149). En conclusión, la infección por virus del Zika induce muerte neuronal por necrosis y en el tejido necrosado se acumulan depósitos de calcio. Y en el modelo de ratón obtenido se reproduce esta condición que es característica del encéfalo humano en gestación afectado por Zika (16,52).

5.3. Efecto de la infección con virus del Zika en la expresión inmunohistoquímica de NeuN

NeuN es un marcador muy utilizado en estudios del neurodesarrollo y también en tejido nervioso adulto. La positividad de NeuN indica la presencia de una célula neuronal postmitótica y por consiguiente que se ha diferenciado por lo menos a neuroblasto (94, 98). El patrón de distribución de las neuronas NeuN+ observado en la corteza cerebral de los controles a los 11 días de edad fue muy similar al observado en otros estudios

realizados en ratones y otras especies, así como el de ratones adultos de 35 días de acuerdo con un estudio realizado anteriormente en el grupo (95). La infección por Zika generó pérdida de inmunorreactividad y menor número de neuronas NeuN+ tanto en corteza cerebral como en el cerebelo; esto es un indicador de pérdida neuronal. Teniendo en cuenta que la literatura científica hace énfasis en la mayor vulnerabilidad de las células progenitoras neurales debido a la presencia de receptores específicos que abundan en ese tipo de células (8), los resultados aquí obtenidos con la inmunohistoquímica de NeuN son evidencia de que también las células postmitóticas pueden ser vulnerables al virus del Zika. En ensayos preliminares mediante PCR habíamos encontrado también subregulación de transcritos del gen NeuN en corteza cerebral y cerebelo por efecto de la infección en el mismo modelo de investigación (138,139). Por otra parte, también habíamos demostrado vulnerabilidad al virus de la rabia de las neuronas corticales inmunorreactivas a NeuN en ratones adultos (95).

La pérdida de NeuN se dio de forma significativa en todas las capas de la corteza frontal, los espacios desprovistos de neuronas se hicieron notorios y la tinción de los perfiles neuronales fue más tenue. La corteza cerebral en el día P11, cuando se sacrificaron los animales, llevaba tres días de finalizado su proceso de corticogénesis (61,65), en los controles, pero en los infectados el virus inoculado en el día P1 tuvo tiempo de alterar los procesos de migración y organización cortical. Así la menor inmunorreactividad de NeuN podría tener relación con pérdida neuronal antes de su posicionamiento o posterior al proceso de migración. Previamente ya se había reportado muerte celular en la infección por Zika (58,135).

La marcación para NeuN en el cerebelo se identificó en la capa granular interna que está conformada por células diferenciadas, mientras que no se observó inmunorreactividad en la capa granular externa puesto que la constituyen células progenitoras (61,85). Tampoco hubo marcación en las interneuronas de la capa molecular. Estas también tienen su origen en células progenitoras de la capa granular externa, pero se diferencian y ocupan su posición definitiva al final de la migración (61,85). Por otra parte, las células de Purkinje, aunque se han diferenciado desde la fase prenatal (61), no expresan el marcador NeuN (93).

En el cerebelo el marcador NeuN no presentó cambios significativos en las folias I-II, III, IV-V aunque en las folias VI, VII, VIII, IX y X la pérdida del marcador fue significativa. El cerebelo en el día P11, no ha terminado su proceso de desarrollo estructural, por lo tanto, el virus estaría afectando una población neuronal en una etapa más temprana del desarrollo, en comparación con la corteza cerebral. Las áreas con menor inmunotinción de NeuN coincide con las folias más afectadas por la formación de calcificaciones y también por su posición anatómica, ya que estas folias (VI, VII, VIII, IX y X) se forman primero durante el proceso de desarrollo del cerebelo, por lo tanto, completan más tiempo de exposición al virus (65). En cuanto a la inmunorreactividad a NeuN en la formación hipocampal esta se distribuyó principalmente en el estrato de células piramidales y en el giro dentado, con excepción de la capa subgranular compuesta en gran parte por células progenitoras (no diferenciadas) que no expresan la proteína.

En conclusión, la pérdida de inmunorreactividad a NeuN indica que el virus del Zika no solamente afecta a células progenitoras sino también a neuronas diferenciadas. En conjunto esta pérdida neuronal en las primeras etapas del neurodesarrollo explica la hipoplasia tanto en el cerebro como en el cerebelo de los animales inoculados con el virus.

5.4. Inmunorreactividad de proteínas de unión a calcio y efecto de la infección por Zika en su expresión tisular

La inmunorreactividad a parvoalbúmina (PV) en los controles a la edad de 11 días fue muy similar a la que se observa en ratones adultos jóvenes (68,150). La expresión de PV es algo tardía durante el neurodesarrollo postnatal en ratas y ratones. Las primeras neuronas PV+ se revelan mediante IHQ a partir del día P6 en las capas intermedias de la corteza (capas III, IV, V) (91). En la corteza cerebral la PV se expresa principalmente en células en cesta y células en candelabro, interneuronas que mantienen contactos con las neuronas piramidales ejerciendo una actividad neuromoduladora muy importante para regular la función excitatoria de las células de proyección cortical (90).

La infección con el virus del Zika en ratones neonatos generó aumento de la inmunorreactividad de PV evaluado a los 10 dpi. Esto se reflejó en incremento significativo

de la inmunotinción cuantificada mediante densitometría óptica, así como en el número de células PV+ por unidad de área de conteo. Esto último se explica porque aquellas células que en condiciones normales expresan baja concentración de la proteína, en los infectados se hacen más visibles (68,150).

En el cerebelo la inmunorreactividad a PV en los controles se hizo visible en las células de Purkinje y en los núcleos profundos. Aquí sí se observa una diferencia importante con la inmunorreactividad observada en ratones adultos en donde también dos tipos de interneuronas de la corteza cerebelar, las células en cesta y las células estrelladas, son PV+ (92,151,152). Esto se explica porque las interneuronas corticales del cerebelo se diferencian a partir de células progenitoras que migran desde la capa granular externa al finalizar la migración hacia la capa granular interna; esto ocurre hasta el día 20P (92).

También en el cerebelo la infección con el virus del Zika produjo incremento significativo en la inmunorreactividad de la PV. Por lo tanto, podría concluirse que puede tratarse de una respuesta sistémica en todo el sistema nervioso, tal como lo hemos hallado previamente en infecciones inducidas con el virus de la rabia en ratones adultos jóvenes en los que este virus induce el aumento en la expresión de PV en la corteza cerebral (150), el cerebelo (141), médula espinal (142) y bulbo olfatorio (153).

Llama la atención la respuesta de esta proteína a estas infecciones virales. En otras patologías en donde se ha estudiado la PV en el sistema nervioso generalmente se han reportado dos tipos de respuesta; la primera es que no se genere ningún cambio como ocurre en la corteza cerebral de pacientes con Alzheimer (154). La otra alternativa es que ocurra una disminución marcada en su expresión, tal como se ha informado en la corteza cerebral afectada por esquizofrenia (155) y enfermedad de Creutzfeld-Jakob (156). Que las infecciones virales hasta ahora evaluadas produzcan un aumento en la expresión de la proteína quizás se debe a una respuesta de las células para tratar de neutralizar el exceso de calcio que ingresa y, que como ocurre en el Zika, puede llevar a la calificación del tejido.

El resultado de la inmunorreactividad a calbindina (CB) en los controles (P11) era lo que se esperaba en cerebelo, pero no en la corteza cerebral. En el cerebelo se observó intensa inmunorreactividad en las células de Purkinje. Se ha establecido que estas

neuronas hacen que el cerebelo sea la estructura del sistema nervioso con mayor contenido de CB (157,158). Sin embargo, también se conoce que la CB está presente en ratas y ratones desde el desarrollo prenatal en la corteza cerebral y estructuras subcorticales (91,159). No obstante, la inmunotinción para CB en los ratones Balb/c a P11 en la corteza cerebral y en áreas subcorticales fue escasa. Apenas se observaron unas pocas neuronas muy bien marcadas, principalmente en la zona de la corteza piriforme.

En los análisis moleculares mediante PCR hemos hallado expresión de genes de CB en corteza y cerebelo de estos animales en P11 (138,139). Quizás los niveles de CB cortical en los ratones Balb/c a P11 no son lo suficientemente altos para ser detectados por inmunohistoquímica. Las pocas referencias bibliográficas sobre el tema corresponden en su mayoría a trabajos en ratas (91,159). En uno de ellos se estableció que la inmunorreactividad se mantiene durante el desarrollo postnatal hasta el día P11 pero luego cae drásticamente y a P15 se observa escasa inmunotinción en la corteza cerebral. Luego de unos días se recupera el patrón normal. Los autores proponen la existencia de dos poblaciones CB+, una que se manifiesta principalmente durante el neurodesarrollo temprano y otra en el neurodesarrollo tardío y fase adulta (159). Sería necesario evaluar la inmunorreactividad a CB en los ratones Balb/c antes y después de P11 para determinar si algo similar podría ocurrir.

La infección con virus del Zika generó disminución de la inmunorreactividad a CB manifestada en un menor número de células de Purkinje CB+ y menos inmunotinción en las que se preservaron. Previamente, mediante PCR, habíamos encontrado subexpresión de CB en el cerebelo de los ratones infectados (138,139). Los estudios de la expresión de CB en infecciones virales son escasos. El virus de la rabia inoculado en ratones jóvenes genera pérdida en la inmunorreactividad de CB en la corteza cerebral y el estriado (140,150), hipocampo (160), médula espinal (142) y bulbo olfatorio (153). Sorprendentemente, la rabia no afectó la expresión de la proteína CB en las células de Purkinje del cerebelo luego de ser evaluada por inmunohistoquímica (157) pero sí se encontró subexpresión del gen mediante PCR cuantitativo (161).

En diferentes neuropatologías estudiadas, la expresión de CB no parece ser afectada igualmente en todas las zonas del sistema nervioso. Así, por ejemplo, en la encefalitis por sida, se encontró disminución significativa de la inmunorreactividad a CB en la corteza

cerebral pero no se halló el mismo efecto en el hipocampo y los núcleos basales (162). Por otra parte, en la enfermedad de Alzheimer la inmunorreactividad de CB no se altera en la corteza cerebral (154) pero esta proteína sí es afectada con pérdida de inmunorreactividad en neuronas colinérgicas del núcleo basal magnocelular (163).

La tercera de las proteínas de enlace del calcio que es utilizada como marcador neuronal es la calretinina (CR). La distribución y características de las células CR+ halladas en la corteza cerebral de los ratones Balb/c en P11 es muy similar a la descrita para ratones adultos jóvenes (150) y ratas (91). La CR parece ser una proteína muy estable; son escasos los reportes de cambios en su expresión en condiciones patológicas (164). La infección con virus de la rabia en ratones apenas produjo una disminución de tamaño en neuronas CR+ sólo en una zona limitada de la corteza del cíngulo, pero ningún otro cambio en la corteza cerebral (150). Por esta razón, llama la atención el aumento en la inmunorreactividad de CR en la corteza de ratones neonatos inoculados con virus del Zika. Teniendo en cuenta su función como una de las proteínas reguladoras del calcio intracelular (89,164) probablemente el aumento en su expresión también puede ser una respuesta para tratar de regular el exceso de calcio en las células, en particular en una neuropatología que presenta como una de sus características formar calcificaciones en el tejido nervioso.

En cuanto al cerebelo CR, la marcación obtenida fue escasa; apenas en dos de las folias. Esta proteína se encuentra en las células granulares, pero aparece tardíamente durante el desarrollo postnatal, es escasa su presencia en ratas a P10. Sólo puede encontrarse en algunas células en cepillo (91,92) como aquí se comprobó. Quizás por esta razón la infección viral no alcanzó a afectar la expresión de CR en el cerebelo. En ratones mutados sin CR se afecta notablemente la coordinación motora (165), una función en la que interviene más activamente el cerebelo pero que es más importante para los animales destetados y adultos.

5.5. Distribución astrogial en ratones controles y efecto de la infección con virus Zika en la expresión de GFAP y S100β.

En la corteza cerebral de los ratones controles (P11) se observó escasa inmunorreactividad a GFAP, apenas una franja de células GFAP+ en la capa VI en estrecha relación con el cuerpo calloso. En ratones de mayor edad (P35-40), de un trabajo anterior, se había observado inmunorreactividad en las capas corticales I y VI pero muy escasa en las capas intermedias (166). La infección con Zika generó aumento notable en el número de células GFAP positivas y estas se hicieron visibles en todas las capas corticales. Este efecto fue similar al reportado anteriormente en ratones adultos inoculados con el virus de la rabia (166,167). La falta de inmunorreactividad en las capas intermedias en los controles se debe a que hay principalmente astrocitos protoplasmáticos los cuales son poco inmunorreactivos a la GFAP en condiciones normales porque tienen escaso contenido de filamentos de la proteína (168). No obstante, en condiciones patológicas se incrementa la cantidad y el grosor de los filamentos de la proteína (166, 169).

En el cerebelo de los controles la inmunorreactividad a GFAP se localizó principalmente en la capa molecular de la corteza demarcando los procesos de la glía de Bergmann que se observan débilmente teñidos al igual que algunos astrocitos en la capa granular. En los ratones infectados con Zika hubo incremento notable en la inmunotinción de la glía de Bergmann que hasta hizo visibles los cuerpos celulares que se localizan en estrecho contacto con los somas de las células de Purkinje. La glía de Bergmann se considera un tipo especial de astrocito y se diferencia directamente de la glía radial (170). Por otra parte, también se intensificó la coloración de la GFAP para distinguir mejor la morfología de los astrocitos en la capa granular. Y en la zona de los núcleos profundos la infección generó inmunorreacción a diferencia de los controles en donde no la hay. En concordancia con estas observaciones previamente habíamos reportado el aumento en la expresión del gen para GFAP en la corteza cerebral y el cerebelo de los ratones infectados con Zika (138,139).

La GFAP es una proteína de filamento intermedio localizada en los procesos celulares de los astrocitos. En condiciones de normalidad poco se expresa en el cuerpo de estas

células gliales, pero sí forma parte de la reacción astrogliar en condiciones patológicas (166,169). Ahora bien, el aumento de la expresión de GFAP, como componente bioquímico de la reacción astrogliar, es un fenómeno esperado en respuesta a una lesión o infección del tejido nervioso, y se supone que es un mecanismo de defensa que tiene como propósito principal aislar el tejido o neuronas afectadas mediante la formación de la llamada 'cicatriz glial'. No obstante, existen diferentes interpretaciones sobre el papel de la GFAP en el sistema nervioso, entre otras, que su verdadera función en respuesta a una lesión del SNC sea hasta ahora desconocida (169).

El otro marcador de astrocitos utilizado, la proteína S100 β , es una proteína de unión a calcio que está distribuida por todo el citoplasma de la célula (171) y en condiciones normales se encuentra en una concentración lo suficientemente óptima como para ser visible mediante inmunohistoquímica. Por esta razón es ideal para hacer conteos celulares de astrocitos. A diferencia de la GFAP no es un buen marcador para los procesos celulares de la astrogliar en condiciones normales, no obstante, en nuestros trabajos previos con ratones adultos (aún no publicado) y en el presente estudio, se obtuvo una buena marcación en los procesos de la glía de Bergmann.

En la corteza cerebral de los ratones controles en P11, la S100 β reveló una distribución uniforme de los astrocitos en todas las capas corticales, similar a la que habíamos observado anteriormente en ratones adultos (166). Por lo tanto, este marcador es más confiable para hacer conteos de astrocitos puesto que la GFAP revela principalmente los filamentos de los procesos y no el cuerpo celular. En los animales infectados con Zika fue evidente el incremento en el número de células inmunopositivas para S100 β en la corteza cerebral. Esta respuesta coincide con la gliosis observada mediante la inmunorreacción a GFAP. También en ratones adultos inoculados con rabia se halló una respuesta similar (166, 172). Por otra parte, en el cerebelo de los controles la inmunotinción a S100 β se distribuyó en la glía de Bergmann, en los astrocitos de la capa granular y en los núcleos profundos (a diferencia de la GFAP). En los animales infectados se observó mayor inmunorreactividad a esta proteína en todas estas áreas del cerebelo. Un efecto similar hemos detectado en ratones adultos inoculados con el virus de la rabia (no publicado aun).

La señalización de Ca^{++} es de gran importancia para la homeostasis de los astrocitos y su interrelación con las neuronas (173). Por tratarse de una proteína de enlace de calcio la sobreexpresión de S100 β podría ser una respuesta para tratar de contrarrestar el exceso de iones calcio que estaría ingresando a los astrocitos en una infección viral que induce la calcificación del tejido nervioso en desarrollo. No obstante, la sobreexpresión de esta proteína puede generar efectos secundarios perjudiciales para la función del sistema nervioso (174).

5.6. Patología dendrítica y expresión de MAP-2 en la infección por virus del Zika en ratones

La técnica de Golgi es el estándar de oro para estudiar la morfología dendrítica. En el cerebro adulto permite demarcar muy bien la morfología de las dendritas, incluyendo las espinas dendríticas (121,122). Adicionalmente, es una excelente herramienta para evaluar los cambios en la morfología neuronal hallados en condiciones patológicas (125,129). Los ratones con apenas 11 días de nacidos aún no han completado su desarrollo neocortical y cerebelar (61), no obstante, el método de Golgi-Cox modificado (123,126) que aquí se utilizó, permitió describir algunas características de las neuronas en desarrollo postnatal y el efecto de la infección por virus del Zika sobre su diferenciación citomorfológica.

La proteína asociada a microtúbulos (MAP-2) es esencialmente un marcador de dendritas en neuronas postmitóticas. Su función principal es establecer puentes de unión entre los microtúbulos que son determinantes para conservar la estabilidad de la estructura dendrítica (175). Por esta razón desde hace algún tiempo se estableció que los cambios de expresión de esta proteína están asociados con patología dendrítica (127). Por lo tanto, la infección con virus del Zika en ratones postnatales genera patología dendrítica asociada a pérdida de expresión de la proteína MAP-2. Con esto se confirma que no sólo las células madre neurales y las neuronas progenitoras son susceptibles la infección con este virus; también lo son las neuronas postmitóticas. Extrapolando al neurodesarrollo humano esto implica que no sólo habría riesgo de afectaciones al sistema nervioso cuando la infección con Zika se adquiere en el primer trimestre de gestación, sino también en estadios más avanzados.

Conclusiones

1. Se confirmó la utilidad del modelo de ratón neonato Balb/c para la investigación de la patogénesis del Zika en el SNC.
2. La citoarquitectura del cerebelo resulta más afectada que la del cerebro en este modelo de ratón neonato. Esto confirma la mayor susceptibilidad de las células progenitoras neurales a la infección con Zika.
3. El efecto de la infección con el virus del Zika en la expresión de las proteínas NeuN y MAP-2 comprueba que también las neuronas postmitóticas son afectadas por esta infección viral.
4. El Zika afecta severamente el metabolismo del calcio durante el neurodesarrollo; esto se refleja con la calcificación del tejido nervioso y los cambios en la expresión de las proteínas de enlace del calcio.
5. La intensa reacción astrogliar generada por el virus del Zika puede afectar el metabolismo de los dos neurotransmisores más importantes del sistema nervioso: Glutamato y GABA
6. La patología dendrítica observada en las neuronas corticales postnatales puede afectar el desarrollo normal de los circuitos neuronales.
7. Este trabajo es una contribución al conocimiento del efecto de la infección con el virus del Zika en las poblaciones neuronales y su integración con la glía.

A. Anexo. Protocolo de bioseguridad para la inoculación y manejo de ratones con el virus del Zika.

1. El investigador principal y demás personas que hacemos parte de la línea de investigación y llevamos a cabo la manipulación de los animales experimentales, hemos tenido experiencias y también se han recibido capacitaciones en todo lo relacionado con el manejo animales en experimentación y bioseguridad en las investigaciones con microorganismos.
2. Las alícuotas de virus del Zika utilizado para inocular los animales fueron obtenidas a partir de cultivos celulares en un trabajo interdisciplinar llevado a cabo en el Instituto Nacional de Salud, con la participación del Grupo de Virología, estas alícuotas se transportan refrigeradas.
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 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. En la manipulación de los ratones posnatales de 1 día, que estarán en la misma jaula con la madre, se deben tener los siguientes cuidados: Antes de manipular las crías se debe impregnar los guantes con el olor de la orina del aserrín de la jaula y luego sujetar las crías por su dorso, con suavidad, sin generar pellizcos, realizar la inoculación intraperitoneal sin penetrar mucho la aguja y devolver la cría, tratando de mantener la organización inicial que tenía la madre.
7. Una vez inoculados los ratones se distribuyen en las cajas y se trasladan al área asignada para animales inoculados con el virus del Zika.

8. Diariamente se llevan a cabo observaciones y pesajes cada dos o tres días, de acuerdo al comportamiento de la madre de la camada, se toma notas sobre el comportamiento de los animales inoculados y sus controles.

9. Para llevar a cabo la fijación por perfusión, los animales se trasladan hasta la cabina de flujo laminar, se inyecta el anestésico y, 3 minutos después se inicia el proceso de disección. Los ratones se inmovilizan sobre una mesa especializada para necropsias, donde utilizando unas cintas se sujetan las extremidades de los ratones, dejando su lado ventral hacia arriba. Este procedimiento, además, permite probar que los animales están bajo anestesia profunda.

10. 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, siempre y cuando se tomen todas las precauciones.

11. Para llevar a cabo la perfusión se introduce una aguja corta en el ápice del ventrículo izquierdo. Inicialmente se deja circular una solución de PBS o solución salina y se esperan 3 segundos para realizar un corte en la aurícula derecha, después se deja circular la solución durante 3 minutos, para extraer la sangre. A continuación se deja circular la solución fijadora (paraformaldehído 4%) hasta completar 40 ml.

12. 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%). 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 Zika.

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 (este y todos los pasos en agitación constante).
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
 - 300 µl de suero Normal de Caballo
 - 300 mg de BSA (Albúmina Sérica Bovina)
 - 100µl de Tritón
 - No lavar
7. Incubación de anticuerpo primario (anti-Zika- producido en conejo) (2 horas).
 - 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 conejo (2 horas)
 - Dilución: 1:600
 - Partiendo de una solución 1/200
 - 6672µl de PBS + 3328µl de secundario 1/200 =10ml secundario 1/600
10. 3 lavados con PBS (10'c/u)

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

- Preparación para cuatro cajas: preparar 30min antes
- 1gota de A + 1 gota de B x cada 5 ml de PBS
- 3 lavados en PBS (10', 5', 5')

12. Revelar con diaminobencidina (Kit DAB-Níquel)

13. Lavar con PBS

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

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 en agitación constante.
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. Para CB, PV y CR se realizó tratamiento para penetración de anticuerpos: Etanol al 10% 20% y 10% (5', 5' 5')
7. Bloqueo: se prepara la siguiente solución. (30 min).
9,4 ml de PBS, 300µl de suero Normal de Caballo, 300mg de BSA (Albúmina)
100µl de Tritón, para CB, PV y CR no adicióno
No lavar
8. Incubación de anticuerpo primario (Toda la noche)
 - *Monoclonales:*
 - Anti-NeuN dilución 1:2500; anti-CB-dilución 1:2500, anti-PV-dilución 1:2500,
 - *Policlonales:*
 - Anti-MAP2 dilución 1:1000; anti-CR dilución 1:1500; anti-GFAP dilución 1:1000; anti-S-100 dilución 1:500
9. 3 lavados en PBS (10', 5' 5')
10. Pasar al anticuerpo secundario (2 horas)
 - Anti-mouse dilución 1:400 (para anticuerpos monoclonales)
 - Anti-rabbit dilución 1:600 (Para anticuerpos policlonales)
11. 3 lavados con PBS (10'c/u)
12. Pasar a solución ABC (complejo avidina – biotina) (2 horas)
 - Preparación para cuatro cajas: 30min antes 1gota de A+1 gota de B x cada 5 ml de PBS
13. 3 lavados en PBS (10', 5', 5')
14. Revelar con diaminobencidina (Kit DAB-Niquel)
15. Lavar con PBS y montar en láminas pre- tratadas con gelatina, dejar secar y montar con citorresina

REFERENCIAS

1. **Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ.** Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509-20.
2. **CDC. Zika virus. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC;** 2016. <http://www.cdc.gov/zika/index.html>.
3. **Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al.** Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* 2016; 374:951-58.
4. **Devakumar D, Bamford A, Ferreira MU, et al.** Infectious causes of microcephaly: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(1):1-13.
5. **Cirino CK, Nkengasong J, Kettler H, et al.** Importance of diagnostics in epidemic and pandemic preparedness. *BMJ Glob Health.* 2019; 4(2):1-8.
6. **European Center for Disease Prevention and Control S. (ecdc).** Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Rapid risk assessment. 2015.
7. **Zellweger RM, Shresta S.** Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Front. Immunol.* 2014;5:1-9.
8. **Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Terskikh A. et al.** .Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell.* 2016;19:1-6.
9. **Bradley MP, Nagamine C.** Animal Models of Zika Virus., *Comparative Medicine, Vols.* 2017;67(3):242–52.
10. **Torres-Fernández O, Rengifo AC, Álvarez D, Corchuelo S, Santamaría G, Monroy-Gómez J, et al.** Obtención de un modelo animal para el estudio de la infección por el virus del Zika. *Biomédica.* 2017;37(3):54-5.
11. **Laiton-Donato K, Álvarez-Díaz D, Rengifo AC, Torres-Fernández O, Usme-Ciro JA, Santamaría G, et al.** Complete genome sequence of a Colombian Zika virus isolated from BALB/c mouse brain after intraperitoneal inoculation. *Microbiol Resour Announc.* 2019;8(46):1-3.
12. **Castiblanco HD, Álvarez-Díaz D, Usme-Ciro J, Rengifo AC, Peláez D, Torres-Fernández O.** Caracterización de los extremos 5' y 3' del genoma del virus Zika circulante en Colombia. *Acta Biol Colomb.* 2019; 24(3):84.
13. **Calvez E, O'Connor O, Pol M, et al.** Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by aedes aegypti from New Caledonia. *Emerging Microbes & Infections.* 2018;7:1-10.

14. **Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ.** Zika virus: following the path of dengue and chikungunya?. *Lancet.* 2015;386:243-44.
15. **Musso D and Nhan T.** Emergence of Zika Virus. *Clin Microbiol.* 2015;4(5):1-4.
16. **Carod-Artal, Francisco J.** Epidemiología y complicaciones neurológicas de la infección por el virus del Zika: un nuevo virus neurotrófico emergente. *Rev Neurol.* 2016;62:317-28.
17. **Kuno G, Chang GJ.** Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza. *Arch Virol.* 2007;152:687–96.
18. **Macnamara FN.** Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of.* 1954;48:139-45.
19. **Geser A, Henderson B, Christensen S.** A Multipurpose Serological Survey in Kenya 2. Results of Arbovirus Serological Tests. *Bull. Org. mond. Sante, Bull. Wld Hith Org.* 1970;43:539-52.
20. **Fagbami A.** Epidemiological investigations on arbovirus infections at Igbo-Ora. *Trop Geogr Med.* 1977;29:187-91.
21. **Fagbami AH.** Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg.* 1979;83:213-9.
22. **Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al.** Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol.* 1975;69:49-64.
23. **Jan C, Languillat G, Renaudet J, Robin Y.** A serological survey of arboviruses in Gabon. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1978;71:140-6.
24. **Olson JG, Ksiazek TG, Gubler DJ, Lubis SI, Simanjuntak G, Lee VH, et al.** A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia. *Ann Trop Med Parasitol.* 1983;77:131-7.
25. **Hayes EB.** Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases,* 2009;15:1347-50.
26. **Duffy MR, Chen TH, Hancock, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al.** Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536-43.
27. **Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al.** Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2013;20:1084-6.
28. **Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM.** Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:595-6.
29. **Dupont-Rouzeyrol M, Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al.** Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014; 2015. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:381-2.

- 30. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al.** A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific 2014. *Arch Viro.* 2016;161:665-8.
- 31. Pan American Health.** Cumulative Zika confirmed and suspected cases reported by countries and Organization territories in the Americas 2015-2016. 2016;12.
- 32. Cuevas EL, Tong VT, Rozo N, Valencia D, Pacheco O, Mercado M, et al.** Preliminary Report of Microcephaly Potentially Associated with Zika Virus Infection During Pregnancy Colombia, January-November 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65:1409-13.
- 33. Adamski A, Bertolli J, Castañeda-Orjuela C, Devine OJ, Johansson MA, Duarte MAG, et al.** Estimating the numbers of pregnant women infected with Zika virus and infants with congenital microcephaly in Colombia 2015-2017. *J Infect.* 2018;76:529-35.
- 34. McCrae AW, Kirya BG.** Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76:552-62.
- 35. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A.** Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitos in Malasia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18:411-5.
- 36. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Gindin D, et al.** Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *Plos Negl Trop Dis.* 2016;10:1-11.
- 37. Maciel-de-Freitas R, Codeco CT, Lourenco-de-Oliveira R. Daily.** survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* , 2007; 76:659-65.
- 38. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al.** The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Elife.* 2015;4:1-18.
- 39. Marcondes CB, Ximenes MF.** Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49:4-10.
- 40. Sai-Yin S, Wing-Shan R, et al.** Zika virus infectiond the next wave after dengue? *J Formosan Med Assoc.* 2016;10:1-17.
- 41. Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM.** Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol.* 2015;68:53-5.
- 42. Atkinson B, Hearn P, Afrough B, Lumley S, Carter D, Aarons EJ, et al.** Detection of Zika virus in semen. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:1-1.
- 43. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, Lanciotti RS, Tesh RB.** Probable nonvector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect.* 2011;17:880-2.
- 44. Tanvir Ferdousi, Lee W.** Understanding the survival of Zika virus in a vector interconnected sexual contact network. *Sci Rep.* 2019;10:1-17.

- 45. Somenarain R, Latchman.** Putative Cellular and Molecular Roles of Zika Virus in Fetal and Pediatric Neuropathologies. 2019, *Pediatr Dev Pathol*, 2019;22(1):1-17.
- 46. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A.** Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses*. 2013;6(1):69-81.
- 47. Sujit Pujhari V, Nissly MR, Masashi N, et al.** Heat shock protein 70 (Hsp70) is involved in the Zika virus cellular infection process. doi: <https://doi.org/10.1101/135350>. *BioRxiv*. 2017.
- 48. Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, Freedman DO, Staples JE, Althabe F, et al.** Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC?. *Lancet*. 2016;387:719-21.
- 49. Cipriano R.** A Report About Zika Virus in Brazil. *Rev Epide e Controle de Infec*. 2016;6.
- 50. Petersen EE, Staples JE, Meaney-Delman D, Fischer M, Ellington SR, Callaghan WM, et al.** Interim Guidelines for Pregnant Women During a Zika Virus Outbreak United States, 2016. *MMWR*. 2016;65:30-3.
- 51. Aragao MFVV, Holanda AC, Brainer-Lima AM, et al.** Nonmicrocephalic infants with congenital Zika syndrome suspected only after neuroimaging evaluation compared with those with microcephaly at birth and postnatally: how large is the Zika virus ‘iceberg’?. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2017;38:1427–34.
- 52. Soares de Oliveira P, Levine D, Melo AS, et al.** Congenital brain abnormalities and Zika virus: what the radiologist can expect to see prenatally and postnatally. *Radiology*. 2016;281:203–18.
- 53. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al.** Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016;387:1531–39.
- 54. World Health Organization.** Guillain-Barré syndrome. El salvador. 2016-gbs-el-salvador/en/., Available from: <http://www.who.int/csr/don/21-january-2016>.
- 55. Agumadu VC, Kamleshun R.** Zika Virus: A Review of Literature. *Cureus*. 2019;10:1-5.
- 56. Gourinat AC, O’Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M.** Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:84-6.
- 57. Marques M, Sousa Santos C, Godinho I.** Neurologic complications in congenital Zika virus infection. *Pediatr Neurol*. 2019;91:3-10.
- 58. Sanz-Cortes M, Rivera AM, Yopez M, Guimaraes CV, et al.** Clinical assessment and brain findings in a cohort of mothers, fetuses and infants infected with ZIKA virus. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218 (4):440-76.
- 59. Rojas J.** Corticogénesis y neurodegeneración: implicaciones de la vía de la reelina en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. *Arch Neurocién*. 2009;14:132-141.

- 60. Rakic P.** Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(10):724-35.
- 61. Goffinet AM, Rakic P.** *Mouse Brain Development.* Springer-Verlag. 2000.
- 62. Szentágothai J.** The neuron network of cerebral cortex: a functional interpretation. *Proc R Soc Lond,* 1978;201:219-248.
- 63. Valverde F.** Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo. *Rev Neurol.* 2002;34:758-780.
- 64. Nieuwenhuys R.** The neocortex. An overview of its evolutionary development structural organization and synaptology. *Anat Embryol.* 1994;190:307-37.
- 65. Zoltán- Molnár P, David J.** *Brain Development.* 2015. Capitulo 19. p. 1-16.
- 66. De Felipe J. Fariñas.** The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol.* 1992;39:563-607.
- 67. De Felipe J.** Cortical interneurons: from Cajal to. *Prog Brain Res,* 2002;136:216-38.
- 68. Torres-Fernández O.** Estudio morfológico, inmunocitoquímico y ultraestructural de las neuronas de la corteza cerebral en ratones afectados por rabia. Instituto Nacional de Salud-Universidad del Valle, 2004, Tesis Doctoral, p. 150p.
- 69. Marin O, Rubenstein JL.** Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev Neurosci.* 2003;26:441–483.
- 70. Wonders C.P, Anderson S.A.** The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006;7 (9):687–696.
- 71. Haydar WA, Tarik F.** Multiplex Genetic Fate Mapping Reveals a Novel Route of Neocortical Neurogenesis, Which Is Altered in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *J Neurosci.* 2013;33(12):5106–19.
- 72. Fernández V, Llinares-Benadero C, Borrell V.** Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned?. *The EMBO Journal.* 2016;35:1-10.
- 73. Lepanto P, Badano JL, Zolessi FR.** Neuron's little helper: the role of primary cilia in neurogenesis. *Neurogenesis.* 2016;3:1-9.
- 74. Higginbotham H, Guo J, Yokota Y, Umberger NL, Li J, Verma N, et al.** Arl13b-regulated activities of primary cilia are essential for the formation of the polarized radial glial scaffold. *Nat Neurosci.* 2013;16:1000-7.
- 75. Baudoin J, Viou L, Launay P, Luccardini C, Gil SE, Alvarez C, Rio J, Boudier T, Lechaire J and Kiyasova V.** Tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron.* 2012;76:1108–22.
- 76. Agirman G, Broix L, Nguyen L.** Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters.* 2017;591:3978–92.

- 77. Barr K, John A.** El sistema nervioso humano: Cerebelo. Mc Graw Hill, 2000. En capitulo 10. p. 181-96.
- 78. Delgado-García JN.** Estructura y función del cerebelo. Rev Neurol. 2001; 33: 635-42.
- 79. Watson C, Paxinos G, Puelles L.** The Mouse Nervous System. Elsevier Inc., 2012.
- 80. Tanaka M, Marunouchi T.** Abnormality in the cerebellar folial pattern. of C57BL/6J mice. Neurosci Lett. 2005;390:182-6.
- 81. Cheng Y, Sudarov A, Szulc KU, Sgaier SK, Stephen D, et al.** Engrailed homeobox genes determine the different foliation. The. patterns in the vermis and hemispheres of the mammalian cerebellum. Development. 2010;137:519-29.
- 82. Sudarov A, Joyner AL.** Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. Neural Develop. 2007;2:26.
- 83. Franklin KBJ, Paxinos G.** The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Elsevier Academic Press; 2008.
- 84. Paxinos G, Watson C.** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th. Edn. San Diego: Elsevier Academic Press; 2007.
- 85. Basson MA, Wingate RJ.** Congenital hypoplasia of the cerebellum developmental causes and behavioral consequences. Front. Neuroanat. Front. Neuroanat, 2013;7:29.
- 86. Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, et al.** Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. Neuron. 2005;47:201–213.
- 87. Machold R, Fishell G.** Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. Neuron. 2005;48:17-24.
- 88. Islam, S.** Calcium Signaling. Dordrecht: Springer Netherlands. 2012.
- 89. Baimbridge K, Celio M, Rogers J.** Calcium-binding proteins in the nervous system. trends Neurosci. 1992;15:303-30.
- 90. De Felipe J.** Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretin in the neocortex. J Chem Neuroanat. 1997;14:1-19.
- 91. Hof P, Glezer I, Conde F, Flagg R, Rubin M, Nimchinsky E, Vogt Weisenhorn D.** Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin and calretinin in the neocortex of mammals phylogenetic and developmental patterns., J Chem Neuroanat. 1999;16:77-116.
- 92. Bastianelli E.** Distribution of calcium binding proteins in the cerebellum. Cerebellum 2003; 2:242-62.
- 93. Mullen R, Buck C, Smith A.** NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates., Development. 1992;116(1):201-11.

- 94. Sarnat HB, Nochlin D, Born DE.** Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev.* 1998;20(2):88-94.
- 95. Rengifo AC, Umbarila VJ, Garzón MJ, 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(4):1362-68.
- 96. Magavi S, Macklis J** Immunocytochemical analysis of neuronal differentiation., *Methods Mol Bio.* 2008;438:345-352.
- 97. Yang Y, et al.** Increased interstitial white matter neuron density in the dorsolateral prefrontal cortex of people with schizophrenia., *Biol. Psychiatry*, 2011;69(1):63-70.
- 98. Guselnikova VV, Korzhevskiy DE.** NeuN as neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae.* 2015; 7:42-7.
- 99. Kirkpatrick, L and Brady, B.** Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton. [ed.] G Siegel, *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6. Philadelphia : American Society for Neurochemistry.1999.
- 100. Monteiro M, Kandravicius L, Pereira P.** O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas. *J. epilepsy clin. neurophysiol.* 2011;17:17-23.
- 101. Infante E, Perez M, Ortega M.** Las Taupatias. *Rev Mex Neuroci.* 2002;3:165-167.
- 102. Dehmelt L, Halpain S.** The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology.* 2004;6:1-10.
- 103. Hurtado AP, Rengifo AC, Torres-Fernández O.** Immunohistochemical overexpression of MAP-2 in the cerebral cortex of rabies-infected mice. *Int J Morphol.* 2015;33:465-70.
- 104. Porras AO, Torres-Fernández O.** Expresión de la proteína asociada a microtúbulos en los núcleos profundos y la corteza del cerebelo de ratones normales y ratones infectados con rabia. *Biomédica.* 2015; 35(3): 224.
- 105. Gonzalez-Perez O, Lopez-Virgen V, Quiñones-Hinojosa A.** Astrocytes: everything but the glue. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015; 2: 115-7.
- 106. Hol E, Pekny M.** Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 32: 121-30.
- 107. Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R.** Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci.* 2010;2:558-70.
- 108. Van den Pol AN, Mao G, Yang Y, Ornaghi S, Davis JN.** Zika virus targeting in the developing brain. *J Neurosci.* 2017; 37:2161–75.

- 109. Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shanagawa R, Kagamiishi.** S100B: astrocyte specific protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2006; 1: 11-6.
- 110. Hurtado AP, Santamaría G, Torres-Fernández O.** Efecto diferencial de la infección con virus de la rabia en la expresión de tres marcadores de astrocitos en corteza cerebral de ratón. *Biomédica.* 2017; 37(3):129-30.
- 111. Donato R, Cannon B, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K et al.** Functions of S100 Proteins. *Curr. Vols. Mol Med.* 2013; 13(1): 24–57.
- 112. Zimmer D, Cornwall E, Iandar A, Song W.** The S100 Protein Family: History, Function, and Expression. *Brain Res Bull.* 1995; 37(4): 417-29.
- 113. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, et al.** S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signa. *I Biochim Biophys. Acta.* 2009.
- 114. Donato R.** Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1450:191-231.
- 115. McLendon R.** considerations, Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied. *Brain Pathol.* 1994; 4: 221-8.
- 116. Şovrea AS, Boşca AB, Georgiu C, Constantin AM, Ben Abdalah MA, Gheban D.** The diagnostic value of immunohistochemistry and silver impregnation techniques for characterization of normal, reactive and tumoral astrocytes. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55(2):525-38.
- 117. Zhang SC.** Defining glial cells during CNS development. *Nature.* 2001; 2: 840-43.
- 118. Zhao C, Deng W, Gage F.** Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.. *Cell.* 2008;132:645-660.
- 119. Nieuwenhuys R.** The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol.* 1994;190:307-37.
- 120. Fairén A, DeFelipe J, Regidor J.** Nonpyramidal neurons: general account. En: Peters A, Jones E, editores. *Cerebral Cortex.* vol. 1. Cellular components of the cerebral cortex. New York: plenum Press. 1984;1:201-53.
- 121. E Pannese.** The Golgi stain: invention, diffusion and impact on neurosciences., *J hist Neurosci.* 1999;8:132-140
- 122. Torres-Fernández O.** La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina(1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. 2006;26:498-508, *Biomédica.*
- 123. Zaqout S, Kaindl AM.** Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers in Neuroanatomy.* 2016;10(38).

- 124. Buell Stephen J.** Golgi-Cox and Rapid golgi methods as applied to autopsied human brain tissue: widely disparate results. *Journal of Neuropathology and experimental neurology.* 1982;5:500-7.
- 125. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE.** Alteraciones de la morfología dendrítica neuronal en la corteza cerebral de ratones. *Biomédica,* 2007;27:605-613.
- 126. Gibb R, Kolb BA.** method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods.* 1998;79:1-4.
- 127. Johnson GV, Jope RS.** The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res.* 1992;33:505-12.
- 128. Torres-Fernández O, Santamaria-Romero G, Rengifo AC, Monroy Gómez JA, Hurtado-cruz AP, Rivera J, Sarmiento L.** Patología dendrítica en rabia: Estudio neurohistológico, inmunohistoquímico y ultraestructural en ratones.. 2014, *Revista De La Asociación Colombiana De Ciencias Biológicas,* 2014;26(2):96-107.
- 129. Monroy Gómez JA Santamaria-Romero, Torres-Fernández O.** Overexpression of MAP2 and NF-H Associated with Dendritic Pathology in the Spinal Cord of Mice Infected with Rabies Virus. 2018, *Viruses ,*2018;10 (112):1-11.
- 130. Enzo Life Sciences.** (29 de Agosto de 2016). Immunohistochemistry - IHC. Obtenido de Enzo life sciences: <http://www.enzolifesciences.com/platforms/immunohistochemistry/>. 2016.
- 131. García del Moral R.** Técnicas inmunohistoquímicas. En: García del Moral R, editor. *Laboratorio de anatomía patológica.* Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 1993. p. 341-68.
- 132. Hockfield S, Carlson S, Evans C, Levitt P, Pintar J, Silberstein L.** Selected methods for antibody and nucleic acid probes. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York; 1993. p. 111-226.
- 133. Reblet C.** Uso de las técnicas inmunohistoquímicas en neurobiología. En: Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia F, editores. *Manual de Neurociencia.* Madrid: Editorial Síntesis; 1998. p. 387-8.
- 134. Oliveira-Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM.** Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in obstetrics & gynecology* 2017;47:6-7.
- 135. Olmo IG, Carvalho TG, Costa VV. Alves-Silva J, et al.** Zika virus promotes neuronal cell death in a non-cell autonomous manner by triggering the release of neurotoxic factors. *Front. Immunol.* 8:1016. doi: 10.3389/fimmu.2017.01016.
- 136. Miner J, et al.** Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell.* 2016;165:1-11.
- 137. Büttner C, Heer M. Traichel J. Schwemmle M.** Zika Virus-Mediated Death of *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2019;13:389.

- 138. Alvarez D, Rengifo A, Rivera J, Naizaque J, Santamaria G, Torres-Fernández O.** Cambios en la expresión de genes asociados al neurodesarrollo en ratones neonatos inoculados con virus Zika. *Biomedica*; 2019;39(3):41-50.
- 139. Alvarez D, Rengifo A, Rivera J, Naizaque J, Torres-Fernández O.** Evaluación de la expresión de genes asociados al neurodesarrollo en el cerebelo de ratones infectados con virus Zika. *Acta biol Colomb.* 2019;24(3):108.
- 140. Torres-Fernández O, et al.** Calbindin distribution in cortical and subcortical brain structures of normal and rabies infected mice. *Int J Neurosci.* 2005;115:1372-85.
- 141. Rengifo AC, Torres-Fernández O.** Cambios en los sistemas de neurotransmisión excitador e inhibitorio en el cerebelo de ratones infectados con virus de la rabia. *Biomédica.* 2013;33(2):80-81.
- 142. Monroy-Gómez J, Torres-Fernández O.** Distribución de calbindina y parvoalbúmina y efecto del virus de la rabia sobre su expresión en la médula espinal de ratones. *Biomedica.* 2013;33:564-73.
- 143. Monroy-Gómez J, Torres-Fernández O** Efecto de la degradación post mórtem sobre la detección inmunohistoquímica de antígenos en el cerebro de ratón. *Revista Investig. Salud Univ. Boyacá.* 2014; 1(1):45-62.
- 144. Rivera J, Rengifo AC, Santamaria-Romero G, Torres-Fernández-O.** Inmunorreactividad de la infección por el virus Zika en retina de ratones. *Biomedica*, Vol. 2019;39(4):1-10.
- 145. Álvarez-Díaz D, Rengifo AC, Rivera J, Santamaría G, Naizaque J, Torres-Fernández O.** Deregulation of genes in the cerebral cortex of BALB/c mice neonates inoculated with Zika virus. *Rev Asoc Col Cienc (Col.).* 2018;30(1):214-5.
- 146. Rengifo AC, Niño EJ, Dueñas Z, Forero ME, Castro CE, Torres-Fernández O.** In silico evaluation of the molecular interaction of the viral protein E of the Zika virus and the Alpha 1 and Glun2A subunits of the GABA-A and NMDA receptors". *Rev Asoc Col Cie.*
- 147. Valverde F.** Golgi atlas of the postnatal mouse brain. Viena: Springer-Verlag; 1998.
- 148. Tamayo-Orrego L, Charron F.** Avances recientes en la progresión del meduloblastoma SHH: mecanismos supresores de tumores y microambiente tumoral. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1823. doi: 10.12688.
- 149. McCartney E, Squier W.** Patterns and pathways of calcification in the developing brain. *Develop Med Child Neurol.* 2014; 56:1009–1015.
- 150. Torres-Fernández O, et al.** Efecto de la infección por el virus de la rabia sobre la expresión de parvoalbúmina, calbindina y calretinina en la corteza cerebral de ratones. *Biomédica.* 2004;24:63-79.

- 151. Torres-Fernández O, Rengifo AC, Santamaría G, Tamayo-Orrego L.** Expresión de tres proteínas de enlace del calcio en neuronas del cerebelo de ratones. *Rev Asoc Col Cienc Biol.* 2009;21(Supl. 1):271.
- 152. Schwaller B, Meyer M, Schiffmann S.** 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* 2002;1(4):241-58
- 153. Torres-Fernández O, Daza NA, Santamaría G, Hurtado SP, Monroy-Gómez J.** 2018. Entry of rabies virus in the olfactory bulb of mice and effect of infection on cell markers of neurons and astrocytes. *Int J Morphol.* 2018;36(2): 670-676.
- 154. Leuba G, Kraftsik R, Saini K.** Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Exp Neurol* 1998;152:278-291.
- 155. Beasley C, Zhang Z, Patten I, Reynolds G.** Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium binding proteins. *Biol Psychiatry* 2002;52:708-715.
- 156. Belichenko P, Miklossy J, Belser B, Budka H, Celio M.** Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 1999;6:269-279.
- 157. Naizaque JR, Torres-Fernández O.** La inmunorreactividad a calbindina en células de Purkinje del cerebelo de ratones no es afectada por la infección con virus de la rabia. *Biosalud.* 2016;15(2):9–19.
- 158. Vigot R, Kado RT, Batini C.** Increased calbindin-D28K immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cell with excitatory amino acids agonists is not dependent on protein synthesis. *Arch Ital Biol.* 2004;142(1):69–75.
- 159. Alcántara S, Ferrer I, Soriano E.** Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. *Anat Embryol.* 1993;188(1):63-73.
- 160. Lamprea N, Torres-Fernández O.** Evaluación inmunohistoquímica de la expresión de calbindina en el cerebro de ratones en diferentes tiempos después de la inoculación con el virus de la rabia. *Colomb Med.* 2008;39(3 Suppl.):7–13.
- 161. Naizaque J, Beltrán J, Santamaría G, Torres-Fernández O.** Efecto de la infección con virus de la rabia en la expresión de tres marcadores neuronales en el cerebelo de ratones. *Biomédica* 2019;39(Supl. 3):73.
- 162. Masliah E, Ge N, Achim CL, Wiley CA.** Differential vulnerability of calbindin-immunoreactive neurons in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995;54:350-7.
- 163. Wu CK, Thal L, Pizzo D, Hansen L, Masliah E, Geula C.** Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2005;195:484-96.

- 164. Fairless R, Williams SK, Diem R.** Calcium-binding proteins as determinants of central nervous system neuronal vulnerability to disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:2146.
- 165. Schiffmann SN, Cheron G, Lohof A, d'Alcantara P, Meyer M, Parmentier M, Schurmans S.** Impaired motor coordination and Purkinje cell excitability in mice lacking calretinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:5257-62.
- 166. Hurtado AP.** Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural del efecto de la infección con virus de la rabia sobre los astrocitos de la corteza cerebral en ratones. Tesis Maestría en Neurociencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2018. 112.p.
- 167. Hurtado AP, Santamaría G, Torres-Fernández O.** Inmunorreactividad de GFAP en la corteza cerebral de ratones inoculados con virus de la rabia. Memoria XI Congreso Nacional XII Seminario Internacional de Neurociencias. Bogotá. 2018: 269-270.
- 168. Miller R, Raff M.** Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* 1984; 4: 585-92.
- 169. Brenner M.** Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett.* 2014;17: 565: 7–13.
- 170. Yamada K, Watanabe M.** Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int.* 2002; 77:94–108.
- 171. Heizmann C, Fritz G, Schäfer B.** S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 2002; 7:1356-68.
- 172. Hurtado AP, Santamaría G, Sarmiento L, Torres-Fernández O.** Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of astrocytes in the cerebral cortex of mice inoculated with rabies virus. Memoria 53 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Armenia. 2018: 210-211.
- 173. Deitmer JW, Singaravelu K, Lohr C.** Calcium ion signaling in astrocytes. En: Parpura V, Haydon PD, Editors. *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System.* Springer: New York. 2009. 700 p.
- 174. Gerlai R, Wojtowicz J, Marks A, Roder J.** Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learning & Memory.* 1995; 2: 26-39.
- 175. Dehmelt L, Halpain S.** The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2005;6(1):204. doi: 10.1186/gb-2004-6-1-204.