

PATOLOGÍA DENDRÍTICA EN RABIA: ESTUDIO NEUROHISTOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL EN RATONES.

DENDRITIC PATHOLOGY IN RABIES: A NEUROHISTOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY IN MICE.

Orlando Torres-Fernández, Gerardo Santamaría, Aura C. Rengifo, Jeison Monroy-Gómez, Andrea P Hurtado, Jorge A Rivera, Ladys E. Sarmiento

Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud (INS). Email: otorresf@ins.gov.co

Recibido: Octubre 8 de 2014

Aceptado: Noviembre 7 de 2014

*Correspondencia del autor: Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud (INS). Email: otorresf@ins.gov.co

RESUMEN

La histopatología de la rabia estudiada con los métodos convencionales revela sólo cambios sutiles, por esta razón, se ha sugerido que la enfermedad se sustenta más en disfunción de origen bioquímico. Este trabajo se llevó a cabo con el propósito estudiar el efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la morfología neuronal en la corteza cerebral de ratones con base en el método de Golgi y establecer alguna relación entre la patología dendrítica y la expresión de la proteína asociada a microtúbulos MAP-2, un marcador de dendritas en cerebro adulto. Como complemento se realizó el estudio ultraestructural de las dendritas para buscar posibles efectos de la infección sobre sus organelos. Los resultados revelaron la existencia de alteraciones notables en la estructura de las neuronas piramidales: disminución en el tamaño del soma, disminución en el grosor de las dendritas, más evidente en la dendrita apical. Igualmente fue menor el número de ramificaciones dendritas y la longitud total de las dendritas. Esta información fue cuantificada con ayuda del programa NeuronJ. Adicionalmente hubo pérdida notable en la densidad de espinas dendríticas. Por otra parte, mediante inmunohistoquímica se encontró aumento en la expresión de la proteína MAP-2, hasta hacer visible el cuerpo neuronal de las células piramidales, un resultado inesperado. Con el microscopio electrónico se observó pérdida de microtúbulos y se hallaron inclusiones electrodensas (figuras de mielina) que sugieren daño en organelos, especialmente, en las mitocondrias. Estos resultados son un aporte importante al conocimiento de la patogénesis de la rabia.

Palabras Claves: Rabia, neuronas piramidales, patología dendrítica, MAP-2, ultraestructura neuronal, técnica de Golgi.

ABSTRACT

Rabies histopathology studied with conventional methods revealed only subtle changes. Therefore, it has been suggested that the disease is more based on dysfunction of biochemical origin. This study was carried out in order to analyze the effect of infection with the rabies virus on neuronal morphology in the cerebral cortex of mice based on the method of Golgi and establish any relationship between the dendritic pathology and expression of microtubule-associated protein MAP-2, a marker of dendrites in adult brain. As a complement, the ultrastructural study of dendrites was carried out in order to look for possible effects of infection on their organelles. The results revealed the existence of significant changes in the structure of pyramidal neurons: decrease in soma size, decrease in thickness of the dendrites more evident in the apical dendrite. Was also 0 fewer dendrite branches and the total length of dendrites. This information was quantified using the NeuronJ program. Additionally, there was significant loss in dendritic spine density. Furthermore, using immunohistochemistry increased expression of MAP-2 protein was found, up to the neuronal body of pyramidal cells visible, an unexpected result. Electron microscopic microtubule loss was observed and inclusions electronlucent (myelin figures) suggesting damage organelles, especially in mitochondria were found. These results are an important contribution to the understanding of the pathogenesis of rabies.

Keywords: Rabies, pyramidal neurons, dendritic pathology, MAP-2, neuronal ultrastructure, Golgi technique.

INTRODUCCIÓN:

La rabia es una enfermedad causada por un virus neurotrópico transmitido generalmente mediante la mordedura de animales contagiados. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO) actualmente se calcula que unas 60000 personas al año mueren como consecuencia de esta enfermedad mortal (1). En Colombia y la mayoría de países de Latinoamérica las campañas de vacunación han logrado disminuir ostensiblemente el impacto de la rabia de origen canino pero persiste el riesgo que representan los animales silvestres vectores del virus de la rabia, especialmente los murciélagos (no solamente los hematófagos) y algunos carnívoros tales como zorros, mofetas y mapaches (1,2). Sobre la rabia se tienen registros históricos que datan de 2300 años antes de la era cristiana. En documentos legales de la antigua Mesopotamia se conminaba a los propietarios de perros a responder por las muertes causadas por las mordeduras de sus mascotas. En 1885, sin conocer aún el agente causal de la enfermedad, Louis Pasteur suministró con éxito la primera vacuna contra la rabia; de esta manera el estudio de la rabia ingresó a la era moderna. Después de décadas de discusión la microscopía electrónica permitió confirmar el origen viral de la enfermedad a mediados del siglo XX (3).

Los signos clínicos de la rabia y su carácter mortal, una vez se manifiestan sus primeros síntomas, hacen de esta una enfermedad que provoca pánico en el paciente y terror en la población. Paradójicamente el examen neuroanatómico macroscópico e histológico del tejido nervioso afectado apenas revela cambios sutiles (4). En gran parte la confirmación post mórtem del diagnóstico de rabia requiere de la demostración de los cuerpos de Negri en el tejido nervioso. Estos corresponden a pequeñas inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas observadas en algunas neuronas que fueron descritos por primera vez por Adelchi Negri en 1903 y se consideran el rasgo patognomónico de la rabia (4,5). La inmunohistoquímica contribuyó a facilitar su localización y a aumentar la confiabilidad del diagnóstico (6).

Al examinar el tejido nervioso afectado por rabia no se reconocen cambios histopatológicos apreciables; tampoco se observa lisis ni muerte neuronal. Por esta razón, diferentes investigadores han defendido la hipótesis según la cual los efectos de la infección son más de tipo bioquímico y metabólico asociados a disfunción neuronal pero preservando la integridad de las células nerviosas (7-11). Inclusive, el fenómeno de la muerte celular por apoptosis, muy frecuente en otras enfermedades infecciosas, no es un componente importante de la pa-

togénesis de la rabia (8,11,12). No obstante, en estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo hemos hallado alteraciones en la morfología neuronal, descritas de forma cualitativa, principalmente, en el cuerpo celular y la arborización dendrítica, utilizando la técnica de Golgi, el método que mejor describe la estructura externa de los componentes de una neurona (13-15).

De acuerdo con estos antecedentes, el propósito de este trabajo fue profundizar en el conocimiento del efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la estructura neuronal con base en el método de Golgi estudiado con herramientas de análisis cuantitativo. Esto se complementó con el estudio inmunohistoquímico de la expresión de la proteína asociada a microtúbulos (MAP-2), una molécula indispensable para la estabilidad del citoesqueleto neuronal, principalmente de las dendritas (16,17). Adicionalmente se procesó tejido cerebral para microscopía electrónica con el objetivo de indagar sobre posibles cambios en la estructura fina de las dendritas y sus orgánulos que pudieran asociarse a la patología dendrítica.

Materiales y métodos:

Inoculación viral y manejo inicial de los animales.

Para este estudio se utilizaron dos tipos de virus de rabia: virus silvestre (tipo calle) aislado del encéfalo de un perro infectado y virus adaptado en laboratorio (tipo fijo) de la cepa CVS (Challenge Virus Standard). Estos fueron suministrados en alícuotas (en dilución 1:10) por el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS). A partir de estas alícuotas se llevó a cabo la titulación de cada uno de los virus inoculando ratones lactantes por vía intracerebral según el método de Reed y Muench (18). Para el desarrollo de los ensayos experimentales se utilizaron hembras de ratones de 28 días (adultos jóvenes) de la cepa ICR (Institute of Cancer Research). Un grupo de 20 animales fue inoculado con virus 'fijo' y otro grupo de 20 animales se inoculó con virus 'calle', previamente titulados. Cada grupo, contó con sus respectivos controles que fueron animales inoculados con solución vehículo, una solución de similar composición a la del inóculo infeccioso pero sin contener el virus de la rabia.

Las inyecciones de los inóculos se llevaron a cabo por vía intramuscular, en las extremidades posteriores, entre los músculos semitendinoso y semimembranoso, utilizando jeringas tipo insulina de 1 ml provistas de

agujas muy delgadas y cortas (calibre No. 27). Para el experimento con virus fijo cada ratón fue inoculado con 0,03 ml de una alícuota con dilución 10^{-1} equivalente a 10^9 DL50 de virus fijo. Para el estudio con virus calle cada animal se inoculó con 0,03 ml de una alícuota con dilución 10^{-1} equivalente a 10^6 DL50. Las diferencias en la DL50 corresponden a la titulación realizada previamente para cada uno de los tipos de virus. Los animales fueron mantenidos en la sala de alta seguridad del bio-terio del INS en condiciones de temperatura ($20\pm 2^\circ\text{C}$) y humedad ($60\pm 5\%$) constantes así como con disponibilidad de alimento y agua a voluntad. Este proyecto y su protocolo de manejo de animales fueron aprobados por el Comité de Ética del INS. Se siguieron las normas éticas y legales exigidas para la investigación con animales de laboratorio en Colombia (Ley 84 de 1989 y Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud).

Obtención y preparación inicial del tejido cerebral.

Cuando los ratones infectados con el virus de la rabia alcanzaron signos de enfermedad avanzada (a los 5-6 días postinoculación para virus fijo y a los 10-12 días para virus calle) manifestados en pérdida de peso, disminución de la temperatura corporal, pelo erizado y escasos movimientos de desplazamiento, se sacrificaron para obtener los encéfalos. De acuerdo con nuestra experiencia y la de otros autores los efectos de la infección se hacen más evidentes sólo en etapas avanzadas de la enfermedad (7,19). El protocolo para el sacrificio y obtención de la muestra de cada animal fue el siguiente: Inyección por vía intraperitoneal de 1 mililitro de una solución acuosa de hidrato de cloral preparada al 30% (dosis de 300mg/Kg). En 3 minutos los animales ya estaban profundamente anestesiados. Luego se fijaron con alfileres con el dorso en contacto sobre una tabla y se les realizó una incisión ventral a través de la pared del tórax para exponer el corazón.

A través del ventrículo izquierdo se introdujo una aguja calibre 27, de un centímetro de longitud, acoplada al extremo terminal de una manguera conectada a una bomba peristáltica. Mediante esta ruta se le suministró a cada animal 50 ml de tampón fosfato salino (PBS) o solución salina al 0.9%. Luego se dejó correr una solución fijadora según la técnica de estudio a seguir con cada espécimen: paraformaldehído (PFA) al 4% para inmunohistoquímica y Golgi-Colonnier o una mezcla de PFA 1% y glutaraldehído (GA) al 3% para microscopía electrónica. Los animales destinados a la técnica de Golgi-Cox sólo fueron perfundidos con solución salina.

Luego se extrajeron los encéfalos, se sumergieron en las mismas soluciones fijadoras utilizadas en las perfusiones y se trasladaron al laboratorio para continuar con el protocolo de procesamiento para cada técnica.

Las muestras de animales infectados con los dos tipos de virus, y sus respectivos controles, se dividieron en cuatro grupos de cinco cada uno para procesarlos separadamente mediante las cuatro técnicas utilizadas en el estudio: Golgi-Colonnier, Golgi-Cox, inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Antes de iniciar cada uno de estos procedimientos se comprobó la presencia de la infección viral en todos los cerebros de animales inoculados con rabia, especialmente en la corteza cerebral, mediante una prueba inmunohistoquímica (como se describe más adelante) con un anticuerpo y un protocolo elaborado por el grupo (6). El área de estudio para todos los experimentos fue la corteza frontal motora en plano coronal y dorsal al cuerpo calloso. Se utilizó como guía el texto-atlas de cerebro de ratón de Valverde (20).

Técnica de Golgi.

Se siguió el método de Golgi-Colonnier para el estudio de la morfología de neuronas piramidales corticales según el protocolo anteriormente estandarizado (13). Rodajas de los encéfalos obtenidas en un plano coronal, de 0,5 cm de espesor, fijadas en PFA 4%, se transfirieron sucesivamente a una mezcla de dicromato de potasio (DP) al 2% y GA al 5% durante 5 días, luego a una solución de DP al 3.5% por 24 horas seguida de una solución de nitrato de plata (NP) al 0.75% durante 24 horas. Después de limpiar los precipitados formados en la superficie de las rodajas se repitieron los pasos por DP y NP y se sumergieron las muestras en una serie de soluciones de concentración ascendente de glicerol (20%, 40%, 60%, 80%, 100%). Estas rodajas se montaron en un vibrátomo para obtener cortes de 150 micrómetros de espesor los cuales se deshidrataron en soluciones de concentración ascendente de etanol, se pasaron por xilol y se montaron en bálsamo de Canadá. Las preparaciones histológicas se observaron en un microscopio equipado con cámara digital y programas informáticos que permitieron capturar imágenes de las neuronas impregnadas, hacer reconstrucciones y análisis cuantitativo de la morfología neuronal mediante el software Neuron J. Como complemento se obtuvieron dibujos esquemáticos de algunas neuronas en un microscopio con cámara lúcida (brazo de dibujo). El método de Golgi-Cox se utilizó para obtener también

imágenes panorámicas de la corteza cerebral con neuronas y procesos neuronales impregnados. El protocolo seguido fue el de Gibb y Kolb (21), brevemente: los encéfalos extraídos de los animales perfundidos con solución salina se sumergieron en una solución compuesta por bicromato de potasio al 5%, cloruro de mercurio al 5% y cromato de potasio al 5% (solución Cox preparada con cinco días de anticipación) en la que se dejaron durante 14 días. Luego se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% por 5 a 10 días. Se obtuvieron cortes coronales de 200 micrómetros de espesor en un vibrátomo y se recogieron en sacarosa al 6%. A continuación los cortes se lavaron brevemente en agua destilada, se trataron con hidróxido de amonio durante 30 minutos, se lavaron nuevamente y se transfirieron a una solución de fijador fotográfico Kodak en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente los cortes se deshidrataron en etanol y xilol y se montaron en bálsamo de Canadá. Se tomaron imágenes panorámicas digitales de la corteza cerebral en el microscopio las cuales se procesaron para estudio densitométrico con el programa ImageJ para evaluar la densidad de ramificaciones de los procesos neuronales.

Inmunohistoquímica

Los especímenes fijados en PFA al 4% fueron procesados para inmunohistoquímica de MAP-2 siguiendo un protocolo básico ya estandarizado en trabajos previos del grupo para el estudio de otros antígenos (6,19,22-26). El procedimiento se resume así: los cerebros se cortaron en un vibrátomo para obtener rodajas de 50 micrómetros de espesor en plano coronal y en dirección rostro-caudal de la corteza frontal. Los cortes se recolectaron en recipientes de vidrio tipo caja de Petri pero de tamaño pequeño (2.5 cm de diámetro x 1 cm de alto), uno para cada espécimen. Inicialmente se lavaron en PBS, durante toda la noche en agitación constante y a temperatura ambiente (aprox. 20°C). Todos los demás pasos se hicieron en las mismas condiciones.

Luego del lavado inicial los cortes se trataron sucesivamente con cloruro de amonio durante 30 minutos (para eliminar restos de aldehídos de la fijación) y peróxido de hidrógeno por 30 minutos (para bloquear la peroxidasa endógena) con lavados en PBS después de cada paso. A continuación los cortes se incubaron durante 30 minutos en una solución preparada en PBS a la que se le adicionó albúmina bovina, suero de caballo y tritón (para bloquear sitios inespecíficos). Inmediatamente y sin lavar, se retiró la solución de bloqueo y los cortes se

incubaron durante toda la noche en la solución que contenía el anticuerpo primario (anti-MAP-2 monoclonal Santa Cruz, dilución 1:1000). Se eligió este tratamiento luego de ensayar tres marcas diferentes de anticuerpos y diluciones en un rango de 1:100 a 1:2500.

Al día siguiente los cortes se lavaron en PBS y se incubaron por dos horas en el anticuerpo secundario (anti-ratón Sigma, dilución 1:400). Luego de lavar en PBS los cortes se trataron, durante dos horas, con una solución de avidina-biotina-peroxidasa (Kit de ABC) en PBS preparada según instrucciones del fabricante (Vector). Para finalizar, luego de un último lavado en PBS, se llevó a cabo el revelado con el cromógeno DAB-Níquel (Kit de Vector). Los cortes se montaron en láminas previamente tratadas con gelatina para su posterior observación. Con ayuda del software ImageJ se capturaron las imágenes y se realizó el estudio densitométrico para evaluar cuantitativamente la intensidad de la inmunotinción en cada preparación y comparar la inmunorreactividad de MAP-2 (expresión localizada de la proteína) entre las muestras de animales infectados con sus controles.

Microscopía electrónica

Los cerebros de animales fijados con PFA al 1% y GA al 3% se cortaron en vibrátomo para obtener rodajas coronales de 200 micrómetros de espesor, a nivel de la corteza frontal por arriba del cuerpo calloso. Estas se procesaron utilizando pequeñas cajas de Petri para cambiar las soluciones de los reactivos de manera similar a como se manejaron las muestras para inmunohistoquímica pero a temperatura de 4°C. Luego de lavarlos con solución tampón de fosfatos (TP) se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora y nuevamente se lavaron con TP. A continuación los cortes se deshidrataron utilizando una serie de soluciones de concentraciones ascendentes de etanol (50, 70, 80, 95, 100%) durante 15 minutos en cada una de ellas, seguida por tratamiento con óxido de propileno (OP) en dos cambios de 15 minutos cada uno. Luego se llevó a cabo la infiltración gradual de los cortes en la resina epóxica Epón-Araldita (EA) iniciando con una combinación de 2 partes de OP y 1 de EA (2OP:1EA) seguida por 1OP:1EA y 1OP:2:EA durante 2 horas en cada tratamiento para finalizar dejando los cortes en resina pura EA hasta el día siguiente.

Fragmentos de cortes que contenían la corteza completa se incluyeron en resina EA (Polysciences) en moldes

planos para mantener su orientación en plano coronal y se polimerizaron a 70°C por 24 horas. A partir de este material se obtuvieron cortes ultrafinos (60 nanómetros de espesor) en un ultramicrotomo LKB; estos se recogieron en rejillas de cobre de 400 mesh, se trataron secuencialmente con acetato de uranilo y citrato de plomo para aumentar el contraste y se observaron en el microscopio electrónico. Se tomaron fotografías en película blanco y negro Tmax ASA 100, se revelaron lo negativos y se escanearon.

Resultados

Patología dendrítica

La técnica de Golgi-Colonnier permitió la observación de neuronas completas, la mayoría de ellas células piramidales que exhibieron su morfología característica. Esta consta, en primer lugar de una larga dendrita apical emergiendo desde el cuerpo neuronal (soma) en dirección de la superficie de la corteza cerebral. Además desde el soma parten dendritas basales y desde las dendritas apicales muchas ramas laterales secundarias y terciarias. La mayoría de dendritas están cubiertas por espinas. En muestras de animales controles se impregnaron en promedio tres células piramidales completas en 1 mm² de área cortical que corresponde a corteza frontal motora. En los animales inoculados con cualquiera de los tipos de virus de la rabia fueron evidentes alteraciones en la morfología neuronal y en particular en el patrón del árbol dendrítico. Estas se resumen así: disminución en el tamaño del soma, disminución en el grosor de las dendritas, más evidente en la dendrita apical. Igualmente fue menor el número de ramificaciones dendritas y la longitud total de las dendritas. Esta información fue cuantificada con ayuda del programa NeuronJ (Cuadro 1).

La técnica de Golgi-Cox impregnó un mayor número de neuronas y dendritas que la técnica de Golgi-Colonnier. Las características morfológicas observadas tanto en las neuronas de muestras control como en las correspondientes a muestras de animales inoculados con rabia fueron muy similares con las dos técnicas pero la mayor densidad de células y procesos neuronales impregnados con el Golgi-Cox permitieron hacer un análisis densitométrico de la pérdida de la arborización dendrítica en las muestras infectadas. Para ello se tomaron imágenes panorámicas (Figura 1 a y b) en las que se cuantificó la densidad de procesos con el programa ImageJ (Cuadro 2). Con cada uno de los dos métodos de Golgi utilizados se

Cuadro 1. Cuantificación (*NeuronJ*) de la longitud de dendritas y tamaño de los cuerpos neuronales (somas) de neuronas piramidales de ratones control e infectados con el virus de la rabia. Se presentan datos obtenidos con animales inoculados con virus ‘calle’. Cualitativamente las observaciones realizadas en muestras infectadas con virus ‘fijo’ fueron similares.

Dendritas	Controles	Infectados
	Longitud en pixeles	Longitud en pixeles
Apical 1 ^a	649 ± 36	402 ± 33
Apical 2 ^a	532 ± 39	338 ± 38
Apical 3 ^a	286 ± 37	97 ± 31
Basal 1 ^a	654 ± 38	320 ± 42
Basal 2 ^a	512 ± 32	156 ± 36
Basal 3 ^a	278 ± 48	94 ± 45
	Valor p longitud dendritas = 0.030*	
Somas (n = 50)	Área promedio en pixeles	Área promedio en pixeles
	20579	9457
	Valor p área de somas = 0,025*	

*Estadísticamente significativo.

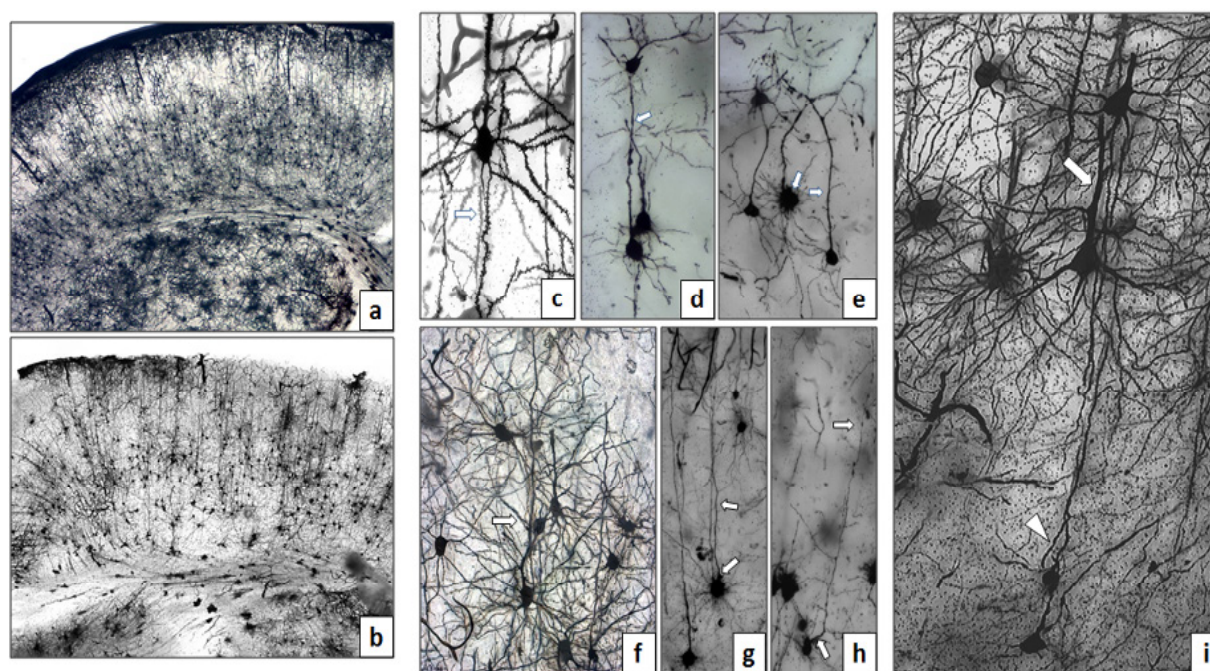


Figura 1. Imágenes de la corteza cerebral de ratones obtenidas mediante la técnica de Golgi. A la izquierda panorámicas de la corteza en un ratón control (a) e infectado (b). En este último se observa menor densidad de procesos neuronales impregnados (10X). En el centro neuronas piramidales de la capa III (c) y capa V (f) en controles. Neuronas piramidales de la capa III (d y e) y capa V (g y h) en infectados. En estos últimos son evidentes los efectos neurodegenerativos (40X). A la derecha imagen que exhibe neuronas piramidales de la capa III (flecha) y de la capa V (cabeza de flecha). Mientras que la neurona de la capa III presenta morfología normal en la neurona de la capa V es notable el daño estructural reflejado en el reducido tamaño del soma y la pérdida de ramificaciones dendríticas (40X).

observaron otros rasgos anormales tales como la pérdida acentuada de espinas dendríticas y la formación de nódulos o protuberancias a lo largo de las dendritas y en algunos axones. Con el método de Golgi-Colonnier se impregnaron principalmente neuronas piramidales mientras que el Golgi-Cox reveló además la presencia de interneuronas, especialmente, células en cesta. Algunas de ellas en las muestras de animales infectados desarrollaron una proliferación anormal de procesos celulares cortos y densamente acumulados alrededor del soma (Figura 1).

Expresión de la proteína asociada a microtúbulos MAP-2.

Las imágenes obtenidas mediante inmunohistoquímica para revelar la presencia de la proteína MAP-2 mostraron marcación acentuada de microtúbulos en las dendritas apicales de las neuronas piramidales. En las muestras de animales infectados la inmunorreactividad (inmunotinción) fue mayor. Tan evidente fue el efecto de la infección con el virus de la rabia que además de aumentar la expresión de la proteína en las dendritas la inmunorreactividad se hizo visible también en los somas de las neuronas piramidales de la capa cinco de la corteza cerebral (Figura 2). El aumento de MAP-2 se

analizó por densitometría óptica con ayuda del programa ImageJ y fue estadísticamente significativo (Cuadro 3).

Ultraestructura dendrítica

El estudio por microscopía electrónica se enfocó a observar detalles ultraestructurales de las dendritas de las neuronas piramidales. En los controles las dendritas mostraron características ultraestructurales normales tales como la presencia de paquetes de microtúbulos orientados paralelamente a la membrana plasmática y mitocondrias abundantes así como un contorno regular en los límites de cada dendrita. El rasgo más significativo que se encontró en el tejido infectado fue la formación de unas estructuras electrodensas (oscuras) dentro de las dendritas (Figura 3). Estas exhibieron un aspecto similar a las que se conocen como figuras mielínicas y adoptaron diferentes formas; eventualmente se hallaron algunas de ellas en los axones. Las dendritas que contenían estas inclusiones anormales tenían la tendencia a ser más engrosadas y de contorno irregular, además fue evidente dentro de ellas la pérdida de microtúbulos y la desorganización de los que se conservaron. Otro detalle relevante fue el escaso número de mitocondrias observadas. Adicionalmente, en algunas dendritas se

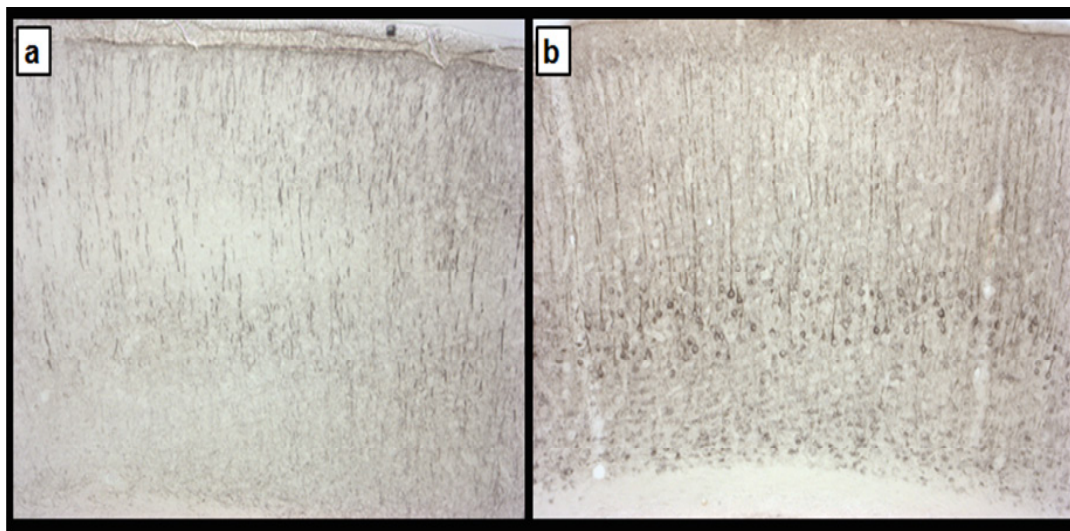


Figura 2. Inmunorreactividad de MAP-2 en la corteza cerebral de ratones. a. Control. b. Ratón infectado con el virus de la rabia (10X). Nótese la mayor inmunotinción en la muestra tomada de animal infectado. Lo más significativo es la inmunorreactividad en los somas de las neuronas piramidales de la capa V (parte intermedia de la imagen). Este efecto no se observa en el control. Inmunotinción con DAB-Níquel.

Cuadro 2. Datos de densitometría óptica obtenidos con el programa *Image J* en imágenes panorámicas de cortes coronales de ratones controles e infectados procesados con la técnica de Golgi-Cox. La pérdida de densidad óptica en la escala de grises (0-255) de los infectados se evidencia en un número mayor de luz transmitida y refleja disminución de procesos neuronales en el neuropilo.

Muestras	Promedio escala de luz transmitida (0-255) Controles	Promedio escala de luz transmitida (0-255) Virus 'fijo'	Promedio escala de luz transmitida (0-255) Virus 'calle'
1	124,729 ± 57	186,182 ± 46	163,093 ± 61
2	133,511 ± 52	187,051 ± 46	167,851 ± 58
3	120,240 ± 46	181,625 ± 52	154,287 ± 48
4	131,150 ± 43	169,554 ± 57	158,327 ± 54
5	129,348 ± 45	177,457 ± 39	140,833 ± 45
Valor p		0,0079*	0,0079*

*Estadísticamente significativo.

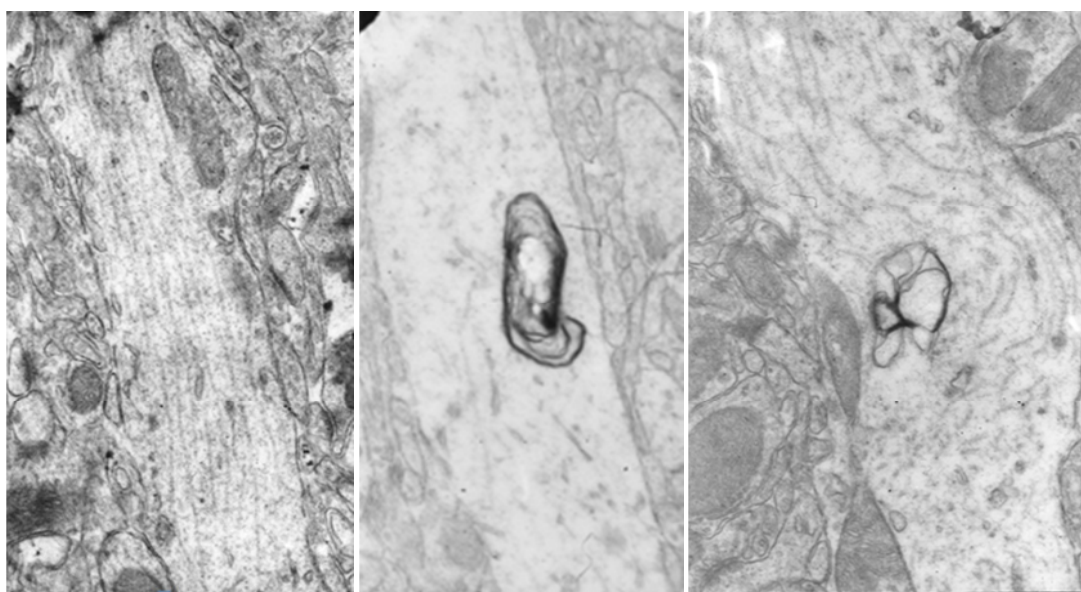


Figura 3. Imágenes tomadas en el microscopio electrónico. A la izquierda una dendrita normal en la que se observan los microtúbulos en orientación paralela a lo largo de la dendrita (24.000X). En el centro una dendrita de material infectado con virus 'calle' de la rabia. Es evidente la pérdida de microtúbulos y la formación de una inclusión membranosa de contorno oscuro (figura mielínica) (19.000X). A la derecha un dendrita de tejido infectado que muestra microtúbulos parcialmente desorganizados y formación de una figura mielínica (24.000X)

formaron vacuolas que interrumpían la continuidad del contenido protoplasmático dentro de la dendrita.

Discusión

En las descripciones histopatológicas del tejido nervioso afectado por el virus de la rabia tradicionalmente se afirma que los cambios observados son casi imperceptibles y que sólo la presencia del cuerpo de Negri confirma el diagnóstico de la enfermedad. Por esta razón

muchos autores han adherido a la hipótesis según la cual los síntomas dramáticos característicos de la rabia se deben más a efectos de la infección sobre el metabolismo de los neurotransmisores y otros compuestos, es decir, que el daño es más bioquímico y funcional que estructural (4,7-11). Pero al utilizar la técnica de Golgi se hicieron evidentes alteraciones profundas en la estructura de las neuronas inducidas por esta infección viral tal como lo demostramos cualitativamente en estudios previos (13,14).

Cuadro 3. Medición densitométrica con el programa *ImageJ* de la inmunorreactividad de MAP-2 en la corteza cerebral de ratones. A la izquierda se registran datos de animales inoculados con virus ‘fijo’ de la rabia y a la derecha con virus ‘calle’. Los valores corresponden a número de píxeles de tono negro. Los mayores valores en muestras de ratones infectados representan el aumento en la expresión de la proteína.

Valores de frecuencia del tono negro (0-255)				Valores de frecuencia del tono negro (0-255)			
Muestra	Controles	Infectados	p valor	Muestra	Controles	Infectados	p valor
1	67481	73604	0,057*	1	35213	46297	0,0143*
2	60955	75065		2	44241	48993	
3	51339	65794		3	41772	49960	

*Estadísticamente significativo.

Con anterioridad, y a pesar de la importancia de la rabia en salud pública, sólo se halló una referencia en donde se reportó muy someramente el efecto del virus sobre las dendritas utilizando el método de Golgi. Este fue realizado por el científico descubridor de la técnica a finales del siglo XIX quien inoculó conejos con virus fijo por vía intracerebral e hizo unas breves descripciones de la histopatología con varias técnicas, entre ellas su método (27), cuando este todavía no había adquirido la relevancia y el desarrollo que le dio posteriormente Santiago Ramón y Cajal y que los hizo acreedores al premio Nobel de Medicina (15). La técnica de Golgi sigue siendo reconocida como el procedimiento que permite demarcar mejor la morfología neuronal completa y por lo tanto el “gold-standard” para estudiar la patología dendrítica (15,20,21,28-31).

En este trabajo confirmamos nuestros hallazgos preliminares pero ahora mediante dos protocolos diferentes (Golgi-Colonnier y Golgi-Cox) y el uso de herramientas informáticas que facilitaron hacer un análisis cuantitativo y podríamos decir que más científico de la importancia de la patología dendrítica en rabia. Por lo tanto, se puede afirmar sin ninguna duda que la rabia sí induce daño neuronal estructural. Esto incluye la pérdida acentuada de espinas dendríticas que coincide con el hallazgo reciente que relaciona a la pérdida de espinas dendríticas en neuronas piramidales del hipocampo con la despolimerización de la F-actina, una proteína muy importante del citoesqueleto de las espinas dendríticas (32). Esto tiene profundas implicaciones en todo lo relacionado con la integración de los circuitos neuronales. Como complemento importante para consolidar esta idea está el hallazgo del efecto del virus sobre la proteína MAP-2, al inducir el aumento en su expresión, algo sorprendente pues la tendencia ha sido asociar la patología dendrítica con pérdida de MAP-2 debido a

que esta proteína establece puentes entre los microtúbulos y confiere estabilidad al citoesqueleto neuronal (16,17,33,34). Sin embargo, también se han reportado casos de neuropatologías con alteraciones dendríticas y aumento de MAP-2 (34-37). Lo que podemos inferir es que tanto el aumento como la disminución de esta proteína darían lugar a desequilibrios en la estructura del citoesqueleto capaces de alterar la morfología y estabilidad dendrítica. En un estudio anterior se reportó pérdida de MAP-2 en cultivos de neuronas infectados con una cepa de virus fijo de la rabia (38) y más recientemente se estudió, mediante inmunofluorescencia de MAP-2, el efecto de la infección con virus calle sobre neuronas piramidales del hipocampo. Los autores sólo hacen una breve descripción cualitativa en donde afirman que no observaron cambios en la integridad de las dendritas apicales marcadas con MAP-2 pero al observar las imágenes del artículo es evidente una mayor inmunorreactividad en las neuronas de las muestras infectadas con el virus (32).

La estructura interna de las dendritas observada con el microscopio electrónico confirma el efecto de daño estructural causado por el virus. La presencia de estructuras del tipo figuras mielínicas abundantes y de relativamente gran tamaño unido a la pérdida de microtúbulos y de mitocondrias en las dendritas, aparentemente no habían sido antes reportados a pesar de que se han realizado numerosos estudios ultraestructurales de tejido cerebral infectado con el virus de la rabia. La explicación más probable está en la orientación que se le dio al tejido cerebral al procesar las muestras de acuerdo con nuestro objetivo de observar la arborización dendrítica de las células piramidales corticales en un plano coronal del corte de encéfalo que permite una vista sagital del soma, la dendrita apical y sus ramificaciones.

Nosotros creemos que las figuras mielínicas aquí observadas pueden corresponder a mitocondrias por su localización y tamaño y porque coincide con la pérdida de mitocondrias normales las cuales son abundantes en los controles. Además recientemente se ha reportado disfunción mitocondrial por métodos bioquímicos en neuronas a causa de la rabia (39). Las figuras de mielina son estructuras que pueden aparecer en tejidos como resultado de alteraciones en organelos membranosos tales como las mitocondrias y el retículo endoplasmático (40,41). En algunas neuropatologías naturales o inducidas experimentalmente se han hallado figuras de mielina asociadas a degeneración de mitocondrias en dendritas y axones (42-45).

En conclusión, con este trabajo hemos demostrado plenamente que el virus de la rabia sí induce daño neuronal estructural, contrario a la hipótesis defendida por otros autores con base en la histopatología convencional. Por lo tanto, no se puede afirmar que las manifestaciones clínicas dramáticas de la rabia correspondan sólo a desórdenes de tipo bioquímico. En otros estudios se han realizado breves descripciones con diferentes técnicas que hacen referencia parcial al efecto de la rabia sobre la estructura dendrítica (32,38,46) mientras que en nuestro trabajo se integraron aspectos morfológicos (usando la técnica que mejor describe la estructura neuronal), con el estudio de la expresión de la proteína del citoesqueleto que soporta la estructura dendrítica y los detalles de la estructura fina observados con el microscopio electrónico.

La patología dendrítica en rabia analizada cuantitativamente, así como el inesperado aumento en la expresión de la proteína del citoesqueleto MAP-2 y los hallazgos ultraestructurales aquí revelados son un aporte importante al conocimiento de la patogénesis de la rabia. Además nosotros trabajamos con un modelo animal y confirmamos nuestros resultados con virus calle, el virus silvestre que circula en la naturaleza, inoculado por la ruta intramuscular, la que mejor se aproxima a las condiciones naturales de contagio de la enfermedad. La mayoría de investigaciones en rabia emplean virus fijo (virus adaptado en laboratorio), cultivos de neuronas primarias, y cuando se lleva a cabo la inoculación de animales vivos generalmente se hace por la ruta intracerebral.

Financiación

Este estudio fue cofinanciado por Colciencias (Proyecto Código: 210454531601) y el Instituto Nacional Salud (INS) y contó con el apoyo de la Asociación Colombiana para el Avance de la Ciencia (ACAC) en el marco del Contrato 378 de 2011. Además dos de los co-autores (JMG y APH) participaron en calidad de Jóvenes Investigadores patrocinados por Colciencias (Convocatorias 525-2011, 566-2012 y 617-2013).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa colaboración del personal del Bioterio y del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. WHO Expert consultation on rabies. En: WHO Technical Report Series No. 982. Geneva: WHO Press; 2013. p. 1-139.
2. Vigilato M, Cosivi O, Knöbl T, Clavijo A, Silva H. Rabies update for Latin America and the Caribbean. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:678-79.
3. Wilkinson L. History. En: Jackson A, Wunner H, editores. Rabies. San Diego: Academic Press; 2002. p. 1-22.
4. Iwasaki Y, Tobita M. Pathology. En: Jackson A, Wunner H, editores. Rabies. San Diego: Academic Press; 2002. p. 283-306.
5. Kristensson K, Dastur DK, Manghani DK, Tsiang H, Bentivoglio M. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of Negri inclusion bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996;22:179-187.
6. Lamprea NP, Ortega LM, Santamaría G, Sarmiento L, Torres-Fernández O. Elaboración y evaluación de un antisuero para la detección inmunohistoquímica del virus de la rabia en tejido cerebral fijado en aldehídos. *Biomédica* 2010; 30:146-51.
7. Tsiang H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. *Adv Virus Res* 1993;42:375-

- 412.
8. Guigoni C, Coulon P. Rabies virus is not cytolytic for rat spinal motoneurons in vitro. *J Neurovirol* 2002; 8: 306–17.
9. Dietzschold B, Schnell M, Koprowski H. Pathogenesis of rabies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;292:45-56.
10. Fu ZF, Jackson AC. Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. *J Neurovirol*. 2005;11:101-6.
11. Hemachudha T, Ugolini G, Wacharapluesadee S, Sungkarat W, Shuangshoti S, Laothamatas J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2013;12:498-51.
12. Jackson AC, Randle E, Lawrance G, Rossiter JP. Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. *J Neurovirol*. 2008; 14: 368–75.
13. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE. Alteraciones de la morfología dendrítica neuronal en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia: un estudio con la técnica de Golgi. *Biomédica*. 2007;27:605-13.
14. Tamayo-Orrego L, Torres-Fernández O. Cambios en la morfología del árbol dendrítico de células de Purkinje inducidos por la rabia en ratones: estudio con la técnica de Golgi. *Salud UIS*. 2008;40:258-9.
15. Torres-Fernández O. La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del Premio Nóbel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica*. 2006;26:498-508.
16. Johnson G, Jope R. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res* 1992;33:505-512.
17. Koleske AJ. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nature Rev Neurosci*. 2013;14:536-50.
18. Habel K. Habel test for potency. En: Meslin F, Kaplan M, Koprowsky H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 369-73.
19. Lamprea N, Torres-Fernández O. Evaluación inmunohistoquímica de la expresión de calbindina en el cerebro de ratones en diferentes tiempos después de la inoculación con el virus de la rabia. *Colom Med* 2008;39 (Supl. 3): 7-13.
20. Valverde F. Golgi atlas of the postnatal mouse brain. Viena: Springer-Verlag; 1998. p. 48-51.
21. Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods*. 1998;79:1-4.
22. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JH, Pimienta HJ. Efecto de la infección por el virus de la rabia sobre la expresión de parvalbúmina, calbindina y calretinina en la corteza cerebral de ratones. *Biomédica* 2004;24:63-78.
23. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JH, Pimienta HJ. Calbindin distribution in cortical and subcortical brain structures of normal and rabies infected mice. *Int J Neurosci* 2005;115:1372-1385.
24. Rengifo AC, Torres-Fernández O. Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia. *Biomédica* 2007;27:548-558.
25. Santamaría G, Rengifo AC, Torres-Fernández O. Expresión de glutamato en la corteza cerebral de ratones normales y ratones infectados con el virus de la rabia. *Revista Científica Unincca*. 2010;15:67-81.
26. Monroy-Gómez J, Torres-Fernández, O. Distribución de calbindina y parvalbúmina y efecto del virus de la rabia sobre su expresión en la médula espinal de ratones. *Biomédica*. 2013;33:564-573.
27. Golgi C. Ueber die pathologische histologie der rabies experimentalis. *Berl Klinis Wochenschrift* 1894;31:325-331.
28. Braak H, Braak E. Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. *Prog Neurobiol* 1985;25:93-139.
29. Jagadha V, Becker L. Dendritic pathology: an overview of Golgi studies in man. *Can J Neurol Sci* 1989;16:41-50.
30. Milatovic D, Montine TJ, Zaja-Milatovic S, Madison JL, Bowman AB, Aschner M. Morphometric analysis in neurodegenerative disorders. *Curr Protoc Toxicol* 2010; Chapter 12:Unit 12.16 doi:10.1002/0471140856.tx1216s43
31. Levine ND, Rademacher DJ, Collier TJ, O'Malley JA, Kells AP, San Sebastian W, Bankiewicz KS,

- Steece-Collier K. Advances in thin tissue Golgi-Cox impregnation: fast, reliable methods for multi-assay analyses in rodent and non-human primate brain. *J Neurosci Methods* 2013;213:214-27.
32. Song Y, Hou J, Qiao B, Li Y, Xu Y, Duan M, Guan Z, Zhang M, Sun L. Street rabies virus causes dendritic injury and F-actin depolymerization in the hippocampus. *J Gen Virol* 2013;94:276-83.
33. Montgomery MM, Dean AF, Taffs F, Stott EJ, Lantos PL, Luthert PJ. Progressive dendritic pathology in cynomolgus macaques infected with simian immunodeficiency virus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999;25:11-9.
34. Kaufmann WE, MacDonald SM, Altamura CR. Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: An immunohistochemical study of the neocortex in Rett syndrome. *Cereb Cortex* 2000;10:992-1004.
35. Yamanouchi H, Zhang W, Jay V, Becker LE. Enhanced expression of microtubule-associated protein 2 in large neurons of cortical dysplasia. *Ann Neurol* 1996;39:57-61.
36. Mukateba-Ladinska EB, Garcia-Siera F, Hurt J, Gertz HJ, Xuereb JH, Hills R, Brayne C, Huppert FA, Paykel SA, McGee M, Jakes R, Honer WG, Harrington CR, Wischik CM. Staging of cytoskeletal and b-amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2000;157: 623-36.
37. Tang L, Lu Y, Zheng W, Li Y. Overexpression of MAP-2 via formation of microtubules plays an important role in sprouting of mossy fibers in epileptic rats. *J Mol Neurosci* 2014;53:103-8.
38. Li XQ, Sarmiento L, Fu ZF. Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated, rabies viruses. *J Virol* 2005;79:10063-8.
39. Alandijany T, Kammouni W, Roy-Chowdhury SK, Fernyhough P, Jackson AC. Mitochondrial dysfunction in rabies virus infection of neurons. *J Neurovirol* 2013;19:537-49.
40. Robards AW, Wilson AJ. Procedures in electron microscopy Vol. I. Chichester UK: John Wiley & Sons; 1993.
41. Lin CH, Chang LW, Wei YH, Wu SB, Yang CS, Chang WH, Chen YC, Lin PP. Electronic microscopy evidence for mitochondria as targets for Cd/Se/Te-based quantum dot 705 toxicity in vivo. *Kaohsiung J Med Sci* 2012;28(7 Suppl):S53-62.
42. Hasan M, Maitra SC, Ali SF. Organophosphate pesticide DDVP-induced alterations in the rat cerebellum and spinal cord: an electron microscopic study. *Exp Pathol (Jena)* 1979;17:88-94.
43. Guiryo DC, Williams ES, Liberski PP, Wakayama I, Gajdusek DC. Ultrastructural neuropathology of chronic wasting disease in captive mule deer. *Acta Neuropathol* 1993;85:437-44.
44. Zhang YL, Tan CK, Wong WC. An ultrastructural study of the ciliary ganglia of cat and monkey (*Macaca fascicularis*) following section of the short ciliary nerves. *J Anat* 1994;185:565-76.
45. Zhang YL, Tan CK, Wong WC. An ultrastructural study of the ciliary ganglia of the cat and monkey (*Macaca fascicularis*) following preganglionic axotomy. *Neurodegeneration* 1996;5:367-77.
46. Scott Rossiter JP, Andrew RD, Jackson AC. Structural abnormalities in neurons are sufficient to explain the clinical disease and fatal outcome of experimental rabies in yellow fluorescent protein-expressing transgenic mice. *J Virol* 2008;82:513-21

* Este trabajo fue presentado como ponencia en el XLIX Congreso Nacional de la ACCB, Sincelejo, Octubre 7-10 de 2014