

REVISIÓN DE TEMA

Receptores para el virus de la rabia

Jaime E. Castellanos, Hernán Hurtado

Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

El virus de la rabia causa una infección en el sistema nervioso que puede provocar la muerte. La patogenia y el neurotropismo de este virus han sido estudiados extensamente con el objeto de explicar el porqué la letalidad de la enfermedad y proponer nuevas alternativas terapéuticas. El proceso de adsorción del virus a la célula blanco se considera un evento que define el neurotropismo del virus. Se piensa que debe existir una molécula en la superficie de las neuronas que une con alta afinidad al virus y da comienzo al proceso infeccioso. Durante los últimos años se han propuesto varias proteínas, carbohidratos y lípidos complejos, como receptores para el virus de rabia y se han hecho nuevas proposiciones de terapia antirreceptor. Además de los gangliósidos y fosfolípidos para los que se ha hallado evidencia sobre su participación en la adsorción del virus de la rabia, hay datos experimentales sobre la participación del receptor nicotínico de acetilcolina, la molécula de adhesión celular neural y el receptor de baja afinidad para neurotrofinas en la infección neuronal. En este artículo se hace una revisión de los datos que sustentan a cada una de las moléculas propuestas, se discuten sus implicaciones para la explicación del neurotropismo del virus de rabia y la exploración de nuevas terapias antivirales.

Palabras clave: virus de rabia, receptor viral, neurotropismo, encefalitis rábica.

Rabies virus receptors

Rabies virus is a neurotropic agent that causes a lethal nervous system infection. Neurotropism and pathogenesis of rabies infection have been extensively investigated to track its progressive role in the host lethal outcome in order to propose new antiviral strategies. Viral neurotropism is defined by specific binding of virus to neuron membrane molecules that promote infection in nervous cells. Several molecules (including proteins, complex lipids and carbohydrates) have been described to act as rabies virus receptors. Some evidence implicates ganglioside and phospholipid participation in attachment of virus to cells; in addition, rabies virus entry into the neurons is associated with involvement of the nicotinic acetylcholine receptor, neural cell adhesion molecule and low affinity neurotrophin receptor. Experimental data that indicate the participation of these molecules in rabies viral neurotropism are presented, along with their implications.

Key words: rabies virus, viral receptors, neurotropism, rabies encephalitis.

La OMS estima que ocurren, por lo menos, 50.000 muertes humanas cada año debidas a rabia, la mayoría en países subdesarrollados de Africa, Latinoamérica y, principalmente, Asia (1). La enfermedad por infección rábica sigue siendo un rompecabezas, pues su patogenia no está

totalmente comprendida y no hay suficiente explicación del porqué de su letalidad. A pesar de que hace más de un siglo existe la vacuna antirrábica y que el tratamiento postexposición temprano es efectivo, una vez que aparecen los signos neurológicos no existe ningún tipo de tratamiento posible.

En los accidentes rábicos, el virus presente en la saliva es inoculado por el animal mordedor en los músculos o la piel; desde allí, el virus puede ser capturado directamente por las fibras nerviosas

Correspondencia:

jcastellanos@hemagogus.ins.gov.co
Teléfono: (571) 220-7700, extensión 434; telefax: (571) 222-3055

Recibido: 10/07/01; aceptado: 14/09/01

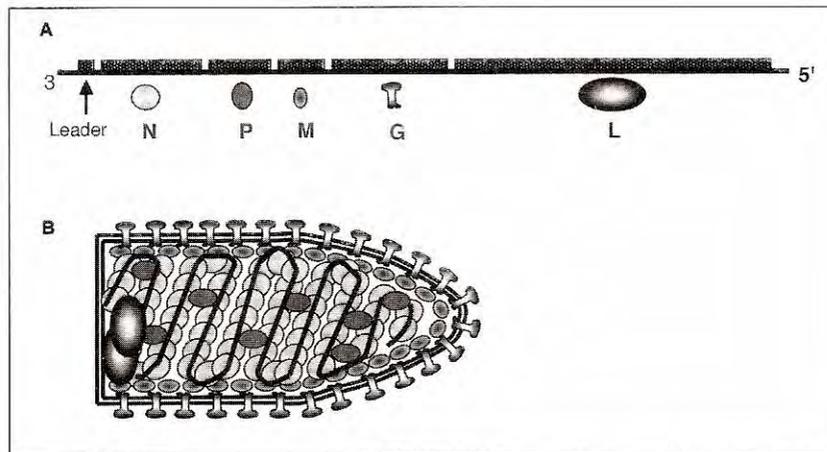


Figura 1. A. Organización del ARN genómico del virus de rabia. El esquema muestra el ARN de una hebra, no segmentado, con las cinco regiones codificantes para cada una de las proteínas estructurales, la secuencia *leader* y cuatro cortas regiones intergénicas. **B.** Esquema del virus de rabia, en el que se han dibujado las proyecciones correspondientes a la glicoproteína viral sobresaliendo de la bicapa lipídica, las proteínas de matriz (M) que rodean la nucleocápside e interactúan con el dominio interno de la glicoproteína. Se esquematiza el ARN asociado con la nucleoproteína (N), las fosfoproteínas (P) y la polimerasa viral (L); este complejo se conoce como ribonucleoproteína (RNP).

sensitivas, motoras y autonómicas o puede presentarse un período de replicación en el músculo esquelético (2,3). Una vez captado por las fibras nerviosas, el virus viaja hacia los cuerpos de las neuronas motoras y sensoriales gracias al transporte axonal retrógrado y desde allí, es llevado hasta el sistema nervioso central (SNC) donde se reproduce de manera muy eficiente y se disemina y da como resultado una encefalitis, generalmente, letal. Desde el encéfalo, el virus puede pasar a otras zonas del cuerpo, especialmente a las glándulas salivares, médula suprarrenal, córnea y corazón, entre otros, y desciende por los nervios periféricos sensoriales y autonómicos (4,5).

El virus y su ciclo

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* (*lyssa*, locura), familia *Rhabdoviridae* (*rhabdos*, tubo), grupo del cual hace parte también el virus de la estomatitis vesicular. Todos los rhabdovirus tienen forma de bala: un cilindro con un extremo redondeado y el otro extremo aplanado (6). Los rhabdovirus poseen una molécula de ARN negativo de una sola hebra, con una longitud aproximada de 12.000 nucleótidos. En el caso del virus rábico, su genoma codifica para las cinco proteínas estructurales que conforman el virus: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la glicoproteína de superficie (G) y

la polimerasa viral (L) (figura 1A) (6,7). Su tamaño promedio es de 180 nm de largo por 75 nm de diámetro y está rodeado por una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped obtenida durante la gemación (figura 1B). En esta bicapa está inmersa la glicoproteína de superficie (proteína G, que es integral de membrana), la cual se considera como responsable del anclaje a las células y, también, la mayor responsable de la inducción de la respuesta inmune en el huésped. La proteína G se organiza en forma de homotrímeros, lo cual tiene una gran importancia en el momento de reconocer el receptor en la célula por infectar y en el proceso de fusión de membrana durante el desnudamiento (8).

El primer paso en la infección corresponde a la adsorción del virus a la célula blanco. Existe amplia evidencia de que la proteína G viral, es la que inicia esta interacción con la molécula receptora celular (figura 2), después de la cual se produce la penetración del virus por medio de un proceso endocítico. La membrana de la célula huésped se invagina en pozos recubiertos de clatrina (*coated pits*) y va rodeando totalmente a los virus en sus receptores, hasta quedar totalmente envueltos en una estructura endosómica, que contiene de dos a cinco viriones (9,10). Los pasos siguientes incluyen el desnudamiento del genoma,

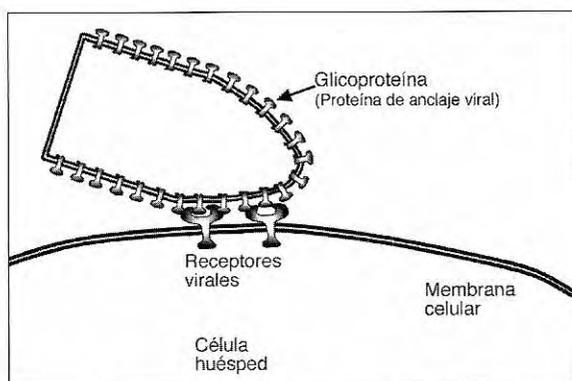


Figura 2. Adsorción de un virus de rabia a la célula huésped. Las glicoproteínas de la superficie del virus (proteínas de anclaje viral, PAV) se unen a moléculas definidas de la membrana de la célula (receptores para virus). Este primer evento del ciclo viral (reconocimiento específico) explica en parte el neurotropismo del virus de rabia, pues se sospecha la existencia de moléculas celulares que se encuentran de manera exclusiva en la superficie de las neuronas y que actúan como receptores para el virus.

la transcripción de ARN genómico y mensajero, la síntesis de proteínas, el ensamblaje y, finalmente, la gemación de la progenie viral.

Por sus características patogénicas, la infección por el virus de la rabia ha sido extensamente estudiada. El virus presenta una estricta restricción en su infección hacia las neuronas, sobre todo *in vivo*, pues en ensayos *in vitro* los mecanismos de adsorción son, al parecer, menos específicos. El virus de laboratorio CVS (*challenge virus standard*), que proviene de la adaptación de un virus salvaje por pasajes seriados en cerebro de ratón, ha mostrado ser altamente patogénico y neurotrópico, pero, a su vez, puede infectar células no neuronales *in vitro*. Su neurotropismo se confirma al usar líneas celulares neuronales o preparaciones mixtas (con neuronas y células no neuronales) (11, 12). Esta revisión se centra en la evidencia existente sobre la participación de diferentes moléculas como receptores para el virus de la rabia, un tema que tiene gran interés para la explicación de la patogenia de la enfermedad y para el planteamiento de terapias antivirales alternativas.

Receptores celulares para el virus de rabia

Los virus requieren de una célula huésped para lograr su replicación. Se considera que la primera molécula de la célula huésped con la que se une

un virus (un 'receptor' viral), es la responsable de la entrada y es la que define el tropismo del virus. La definición actual de tales receptores virales implica que son una molécula de la superficie celular que participa no sólo en la unión del patógeno sino en la promoción de la infección (13).

Se ha encontrado que un virus puede usar más de un tipo de molécula celular para su anclaje, en principio, para evitar las restricciones de su tropismo y también para garantizar su replicación. Para algunos virus en los que se han identificado receptores específicos, se ha podido comprobar la presencia de 'correceptores' que, actuando conjuntamente, modulan o contribuyen a las funciones del receptor 'principal' (13,14). La identificación de receptores para virus se ha convertido en toda una área de investigación en virología, pues, a través de ese conocimiento, se pueden interpretar las bases moleculares del tropismo viral y la patogenia de la infección. Además, esa información es muy importante para el diseño de terapias antivirales. El marcado neurotropismo del virus de la rabia permite suponer la presencia de 'moléculas receptoras' específicas y exclusivas en la superficie de las neuronas que cumplen el papel de capturar al virus con alta afinidad y dar comienzo al proceso infeccioso.

Moléculas no proteicas

Los gangliósidos (glucoesfingolípidos a los que se han esterificado de una a cinco moléculas de ácido siálico) han sido investigados en su función como receptores para el virus de la rabia. En el estudio realizado por Superti y colaboradores (15), los cultivos de células CER (*chicken embryo related*) tratados con neuraminidasa (glucosidasa bacteriana) no se infectaron con el virus y al agregar de nuevo los gangliósidos a las células, se restablecieron los niveles de infección. De igual manera, al pretratar al virus con estos lípidos, perdió su capacidad de infectar por estar bloqueada la glicoproteína viral por los gangliósidos (15). En otro trabajo, se logró inhibir parcialmente la infección de monocapas de CER por el virus de rabia, cuando se hizo una preadsorción del virus con liposomas obtenidos de cerebro de rata; de esta manera, se fortaleció la evidencia de que los gangliósidos participan en el complejo receptor para el virus en el SNC (16).

Conti y Tsiang (17, 18) reportaron trabajos en los que hicieron digestión de monocapas CER con neuraminidasa, con el fin de eliminar el ácido siálico de los gangliósidos de membrana, y a otros cultivos les adicionaron lectinas para impedir estéricamente los azúcares asociados con gangliósidos y encontraron que con ambos tratamientos las células se infectaron en menor proporción. Los glucoesfingolípidos se encuentran en la mayoría de las células de mamíferos, pero están altamente concentrados en las zonas de sinapsis; esto concuerda con el hallazgo frecuente de los viriones en estas regiones (19). A pesar de esta evidencia experimental sobre la participación de los gangliósidos en la adsorción del VR, existe también evidencia en contra de su participación (10).

Puri y colaboradores sintetizaron liposomas con fosfatidilcolina (eléctricamente neutros) y con fosfatidilserina (eléctricamente negativos) y trataron con neuraminidasa al virus haciendo pruebas para determinar la fuerza de la unión a los liposomas; demostraron que la ausencia de ácido siálico en las proteínas virales no afecta la adsorción a las membranas y propusieron que, en el fenómeno de adsorción viral, tiene mayor importancia el estado electrostático de la membrana, conferido por los fosfolípidos celulares (20). La dificultad mayor para la interpretación de los trabajos con enzimas, consiste en que los tratamientos modifican químicamente las superficies celulares, pero también cambian fuertemente sus condiciones eléctricas, produciendo múltiples cambios celulares a los que se les puede responsabilizar de la disminución de los niveles de infección.

En resumen, se ha encontrado una interacción entre el virus y algunos lípidos complejos y algunos carbohidratos, pero no se ha establecido con precisión el verdadero papel de estas moléculas no proteicas en el proceso específico de infección o no se sabe si ellos hacen parte de un complejo molecular con componentes diversos.

Proteínas como receptores

Receptor para el virus de la rabia en fibroblastos

El virus CVS obtenido en cerebro de ratón puede ser, a su vez, adaptado *in vitro* para infectar células

de tipo no neuronal como las BHK-21 (*baby hamster kidney*)(14). Después de lograda la adaptación, el virus infecta con gran eficiencia estas células y se producen grandes cantidades de virus que pueden ser recuperados en el medio de cultivo. Este virus (CVS-BHK) es el preferido para los trabajos de investigación y diagnóstico en la mayoría de laboratorios del mundo por su homogeneidad y por su facilidad de obtención y titulación. Se ha encontrado un complejo molecular en las células BHK-21 que es el responsable de la unión del virus con alta especificidad, aunque no se caracterizó completamente. Se trata de una molécula de naturaleza proteica asociada con carbohidratos, pues es sensible a proteasas y sialilasas. El complejo proteico (integral de membrana) tiene aproximadamente 450 kDa y une con alta afinidad virus radiomarcado, de manera independiente de Ca^{++} y Mg^{++} . En condiciones denaturantes, se separa en dos proteínas de alto peso molecular y, por lo menos, en otras cuatro proteínas de menor peso. Se encontró que uno de los componentes (aproximadamente de 200 kDa) comigra con la fibronectina en las electroforesis.

A pesar de la metodología utilizada, no se obtuvo la información sobre qué tipo de proteína era, ni si se encuentra en otros tipos de células tales como neuronas o si tiene alguna relación con otros receptores; por tanto, no explica el comportamiento tan selectivo del virus *in vivo*. Sin embargo, las características bioquímicas de la molécula hacen suponer que en este receptor fibroblástico participe alguna isoforma de la molécula de adhesión celular neural (NCAM), como se verá más adelante (21).

El receptor nicotínico de acetilcolina

La neurotoxina peptídica más conocida y usada para el estudio de receptores colinérgicos es la α -bungarotoxina (α -BGT, un antagonista del receptor nicotínico) (figura 3). El sector 30-40 de esta toxina tiene similitud con la secuencia 189-199 de la glicoproteína del virus de rabia. Por esta razón, varios autores han sugerido que podrían existir mecanismos de unión similares entre ambas proteínas con el receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH) (22,23). Esta propuesta ha

sido evaluada usando varias metodologías y se ha encontrado una fuerte evidencia de la participación del receptor nicotínico de acetilcolina en la infección.

La evidencia bioquímica aportada por el grupo de Thomas Lentz sobre la interacción entre el virus y el receptor nicotínico es amplia. El análisis de los modelos estructurales han confirmado que la similitud toxina-glicoproteína viral no es sólo en la secuencia primaria sino también en la secundaria, pues el *loop 2* (neurotóxico de los venenos) y el correspondiente segmento en la glicoproteína viral son hojas beta que tienen una conformación espacial también muy similar. Los ensayos de desplazamiento en pruebas de binding en fase sólida (usando RNACH purificado del pez eléctrico torpedo) demuestran una competencia entre la α -BGT y un péptido sintético de 29 residuos de la glicoproteína viral (175-203) (24). Anticuerpos monoclonales y policlonales producidos contra el mismo péptido reconocen con gran especificidad la α -BGT, otras toxinas ofídicas y al virus de la rabia íntegro, confirmando también similitud antigénica (25). Anticuerpos monoclonales contra el segmento correspondiente de la α -BGT inhiben efectivamente la infección *in vitro* (26) y, adicionalmente, los péptidos provenientes de la glicoproteína viral o de la α -BGT bloquean efectivamente la actividad inducida por acetilcolina en preparaciones de músculo (27). Finalmente, también se ha encontrado que el virus se une con alta especificidad a la subunidad α de los RNACH (28). Por otro lado, se ha reportado que anticuerpos antiidiotipos, dirigidos contra anticuerpos de ratones inmunizados con el virus (que reproducen la imagen especular de la proteína G viral) reconocen los receptores nicotínicos y reaccionan con alta especificidad con el suero de animales inmunizados con el virus de la rabia, aportando evidencia adicional sobre las similitudes antigénicas de las dos proteínas (29). A pesar de estos trabajos, algunos de estos péptidos o fármacos nicotínicos no modifican la infección en células de neuroblastoma humano IMR-32, lo que parece estar evidenciando interacciones de baja afinidad en esta línea celular *in vitro* o, eventualmente, la ausencia de los receptores adecuados (30).

Al hacer inoculaciones experimentales, el virus de la rabia se acumula en cercanías de la unión neuromuscular (donde reside gran cantidad de RNACH) (31). Además, al comparar la susceptibilidad de algunos animales salvajes frente a una cepa de virus estándar, se encontró que está relacionada con la densidad poblacional de receptores nicotínicos en los músculos de los animales (32). Los estudios con cultivos de células musculares de pollo y de rata tratadas con α -BGT demostraron que las células se infectaron en menor proporción, lo cual indica algún tipo de competencia por el receptor de acetilcolina en ese modelo (33).

Los ensayos realizados sobre cultivos primarios de ganglio sensorial de ratón adulto han evidenciado que los antagonistas nicotínicos tubocurarina y mecamilamina inhiben parcialmente la infección por el virus de la rabia (34). Además, si se utilizan agonistas como la nicotina y el carbacol también se logra inhibir la infección de las neuronas hasta en un 50% (35,36); en ninguno de los dos casos, los fármacos disminuyeron la infección en células no neuronales presentes en estos cultivos mixtos (fibroblastos y células de Schwann).

Debe anotarse, sin embargo, que existen datos que plantean dudas sobre el papel del RNACH como puerta de entrada del virus rábico a las células. La evidencia más fuerte en este sentido es el hecho que líneas celulares que no poseen este receptor son fácilmente infectadas por el virus rábico (37), pero hasta el día de hoy, se puede explicar el porqué de este comportamiento si tenemos en cuenta la caracterización de otros presuntos receptores presentes en estas líneas celulares. Además, la definición de presencia o ausencia de un receptor a acetilcolina se había hecho hasta hace poco con base en la unión de la α -BGT a las células y hoy se sabe que muchos receptores nicotínicos no ligan esta toxina y pueden eventualmente participar en la infección (38).

La molécula de adhesión celular neural (neural cell adhesion molecule, NCAM)

El término NCAM corresponde a tres proteínas relacionadas, producto del 'ensamble alterno'

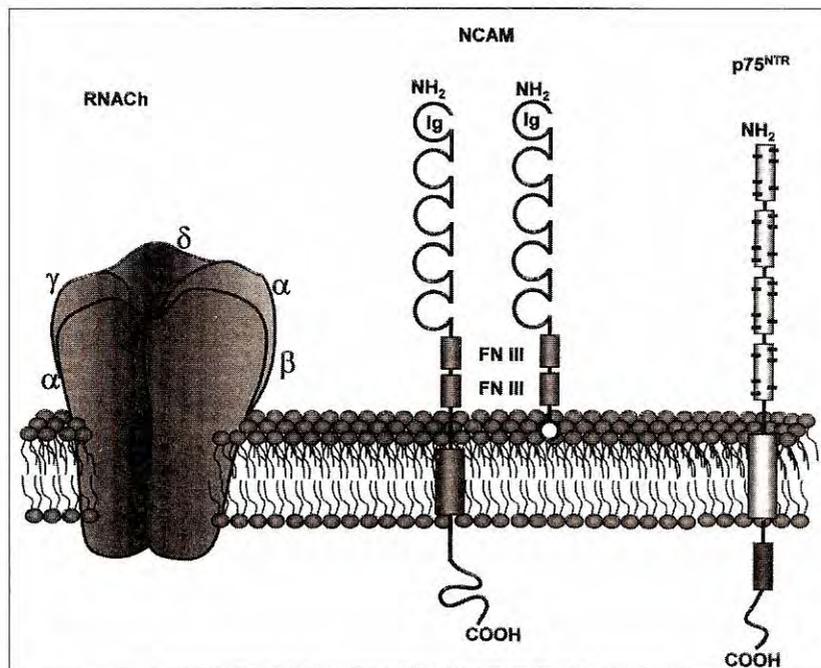


Figura 3. Esquema de la estructura de las proteínas identificadas como posibles receptores para virus de rabia, receptor nicotínico de acetilcolina (RNACH), el receptor de baja afinidad de neurotrofinas (p75^{NTR}) y la molécula de adhesión celular neural (NCAM). El receptor de acetilcolina está formado por cinco subunidades que al ensamblarse forman un canal por el que pasan cationes al ser estimulado por el neurotransmisor; en este dibujo se hace un bosquejo del receptor de tipo muscular, aunque se supone que los receptores de tipo neuronal se ensamblan de manera similar. Las proteínas NCAM son moléculas de adhesión altamente glicosiladas que se encuentran en las células como tres isoformas (120, 140 y 180 kDa), cuyos dominios extracelulares son iguales. La isoforma de 120 kDa no presenta dominio intracelular y se ancla a la membrana a través de un enlace a un fosfolípido de tipo glicoinositolfosfato. La diferencia entre las isoformas de 140 y 180 kDa es únicamente en el tamaño de su dominio citoplasmático. La región extracelular posee cinco dominios similares a los de las inmunoglobulinas (Ig) y dos dominios de unión a fibronectina III (FN). El receptor de baja afinidad para las neurotrofinas (p75^{NTR}), además de su región transmembranal, posee en su región extracelular cuatro dominios ricos en cisteína (6 en cada dominio) y un dominio intracelular (dominio de muerte celular) que envía señales para los eventos apoptóticos.

(*splicing*) de un gen único. Dos de ellas poseen un dominio citoplasmático más o menos corto (140 y 180 kDa) y la tercera proteína (120 kDa), que está anclada a las membranas a través de un glicofosfatidilinositol, carece de dominio citoplasmático (39). Las tres isoformas, altamente glicosiladas, poseen cinco dominios de inmunoglobulina y dos dominios de unión a fibronectina en su porción extracelular (figura 3). A pesar de su nombre, la proteína no se expresa exclusivamente en el tejido nervioso, es más, las isoformas de 140 y 120 kDa están presentes en casi todo tipo de células en los estadios embrionarios, pero en las neuronas adultas se expresa solamente la isoforma de 180 kDa. Tienen un papel muy importante durante el desarrollo del

sistema nervioso, pues sirven como guía para la elongación de los axones e intervienen en la estabilización de los contactos celulares, principalmente en las sinapsis (40). La isoforma de 140 kDa se expresa en algunas neuronas y en células musculares, pero también en ciertos tipos de linfocitos, en donde corresponde al antígeno humano de diferenciación CD56.

El Grupo de Neuroinmunología Viral del Instituto Pasteur de París presentó una serie de evidencias que explican tanto el neurotropismo del virus como su facilidad para infectar células no neuronales (21). Encontraron que las líneas celulares con mayor susceptibilidad a la infección poseen NCAM. Por ejemplo, las células de tipo neuronal (neuroblastomas humanos y murinos) o de tipo

fibroblástico (BHK-21, VERO, NIH 3T3) presentan fuerte inmunofluorescencia para NCAM, en cambio las células resistentes a la infección (L-929, HEP-2 y HeLa) son negativas para esta molécula de adhesión.

Si las células BHK-21 o las de neuroblastoma N2a se incuban con anticuerpos policlonales y monoclonales (anti-NCAM) y, luego, se infectan, la proporción de células infectadas se disminuye significativamente. Igual disminución ocurre si las células se incuban con uno de los principales ligandos endógenos de la NCAM (el heparán sulfato). En estos experimentos, los porcentajes de inhibición de la infección fueron dependientes de la dosis usada de inhibidor. Las proporciones de células BHK infectadas se disminuyeron casi de manera absoluta, al hacer una preincubación del inóculo viral con diferentes concentraciones de proteína NCAM soluble, lo cual sugiere que ésta se une de manera específica a la glicoproteína viral impidiendo que el virus pueda entrar en contacto con las células.

Además de los experimentos mencionados, se reporta una serie de experimentos *in vitro* que usan neuronas de ratones transgénicos a los que se les había eliminado el gen para la proteína NCAM (ratones deficientes en NCAM o *NCAM-knock out*, NCAM-ko), para comprobar el papel de la proteína durante la infección. Solamente la mitad de las neuronas corticales cultivadas de ratones neonatos NCAM-ko se infectan, en comparación con los cultivos de corteza de ratones normales; la cantidad de virus liberada al medio de cultivo por los primeros, fue solamente la cuarta parte de lo que produce un cultivo realizado a partir de ratones normales; así se demostró que la ausencia de NCAM disminuye significativamente la susceptibilidad de los cultivos a la infección por virus.

Los autores también probaron si los fibroblastos L que no poseen NCAM y que son naturalmente resistentes a la infección, al ser transfectados con un cADN que codifica para las isoformas de NCAM de 180 y 140 kDa, se volvían susceptibles a la infección. Así se encontró que la transfección produjo un incremento en el porcentaje de células infectadas, pues en las células control fue del 15%,

mientras que en las células transfectadas con los cADN para NCAM 180 y 140, el porcentaje de células positivas para el virus fue de 48 y 40%, respectivamente. El análisis por citofluorometría demostró que la gran mayoría de las células infectadas presentaban una marcación intensa para la proteína y se encontró, además, que la infección se podía bloquear incubando las células transfectadas con heparán sulfato o con anticuerpos anti-NCAM antes de realizar la infección.

Al hacer la inoculación del virus en el músculo masetero de ratones NCAM-ko y normales se halló antígeno viral en los cortes sagitales del cerebro al sexto día postinfección, pero mucho más restringido en los ratones NCAM-ko, incluso casi ausente en la corteza cerebral. Se hizo paralelamente la cuantificación del antígeno viral (anti-proteína N), por medio de una ELISA de captura en homogenizados del tallo-cerebelo, el diencéfalo y la corteza. El resultado demostró que en la zona del tallo-cerebelo, la concentración de nucleoproteína es cuatro veces menor en los ratones deficientes y en el diencéfalo y en la corteza, la cantidad de antígeno de virus rábico fue 10 veces menor con respecto a los ratones normales.

La prueba final consistió en hacer la inoculación del virus en las patas traseras y evaluar la mortalidad. La mitad de los ratones normales murieron al noveno día postinoculación mientras que la mitad de los ratones NCAM deficientes murieron al decimotercer día. En los trabajos realizados en conjunto por nuestro laboratorio y el Grupo de Neuroinmunología Viral del Instituto Pasteur, se hizo la cuantificación del antígeno viral por medio de un sistema de fósforo imagen con un anticuerpo secundario acoplado a 125 I. Se infectaron ratones normales y ratones NCAM-ko, en las patas posteriores y a los seis días postinfección se obtuvo el tejido nervioso para hacer el procesamiento (figura 4). En los cortes de cerebro tomados de los ratones deficientes en NCAM, se evidenció una menor cantidad de virus en los primeros animales y una muy clara diferencia en la distribución del virus en la médula espinal, el tallo, el cerebelo y la corteza (figura 5) (41).

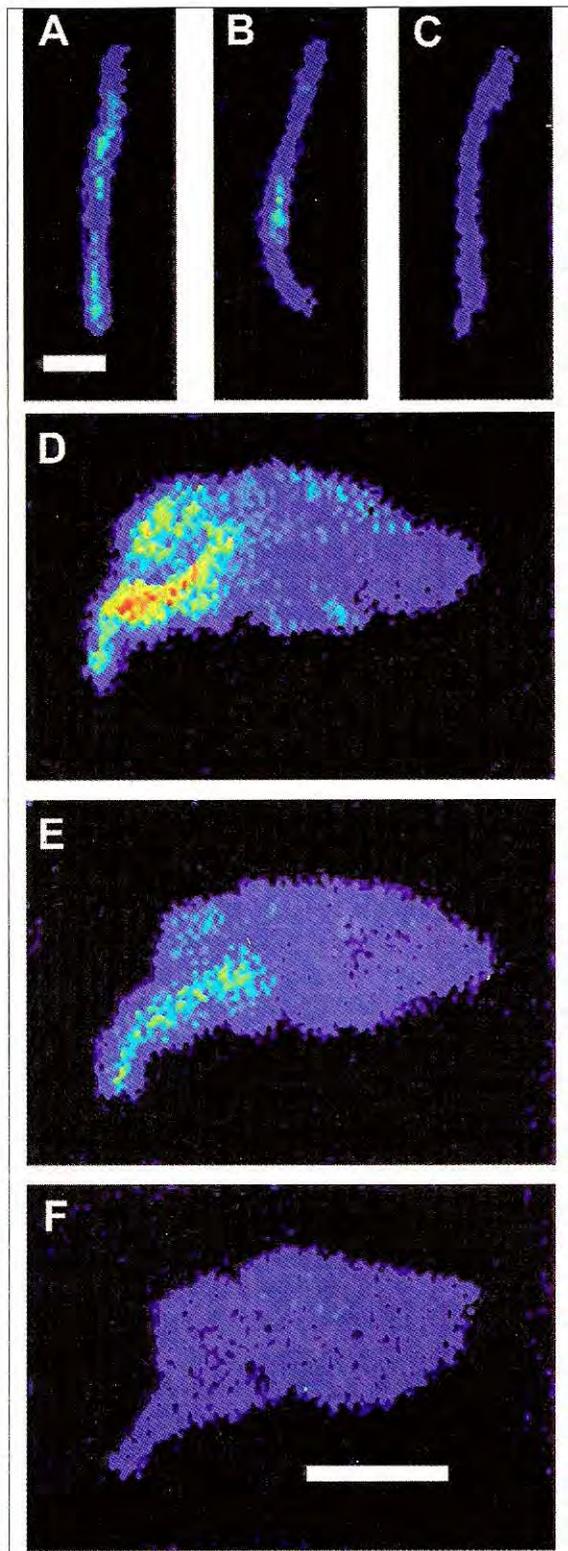


Figura 4. Detección de antígeno viral (nucleoproteína) en cortes de SNC provenientes de ratones normales y ratones β deficientes en la proteína NCAM, usando las emisiones de un anticuerpo secundario acoplado a I^{125} y capturadas por una cámara de video (*phosphoimager*, β -imagen). Seis días postinfección. **A.** Corte longitudinal de médula espinal de un ratón normal infectado con virus CVS-BHK. **B.** Médula de un ratón deficiente en la proteína NCAM. **C.** Médula de un animal control no infectado. **D.** Corte sagital del encéfalo de un ratón normal 6 días después de la infección con CVS-BHK. **E.** Encéfalo de un ratón NCAM-ko infectado. **F.** Encéfalo de un ratón control no infectado. Nótese la presencia del antígeno viral en regiones e intensidades diferentes en los dos tipos de animales. La barra corresponde a 10 mm.

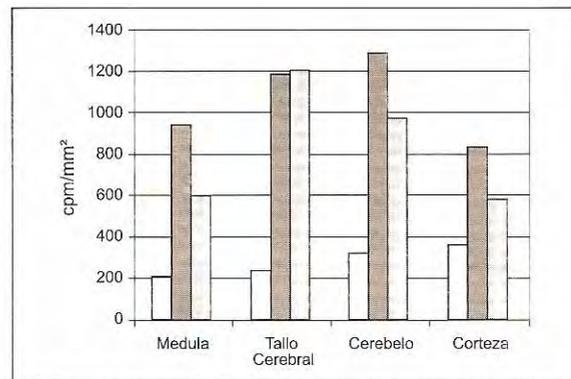


Figura 5. Cuantificación de la infección por β -imagen en cortes sagitales de ratones normales y deficientes en la proteína NCAM; valores representativos de tres experimentos. Barra blanca, control no infectado. La barra gris oscuro corresponde al ratón normal y la barra gris claro al ratón NCAM deficiente.

La evidencia experimental presentada en estos trabajos (21) esclarece el papel tanto *in vitro* como *in vivo* de la proteína NCAM en el proceso infeccioso y en la patogenia de la infección rábica, definiendo su importancia en la mayoría de los eventos del ciclo viral y de la enfermedad inducida por las cepas virales adaptadas a cultivos.

El receptor de baja afinidad para neurotrofinas ($p75^{NTR}$)

El factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*, NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF) y la neurotrofina 3 (*neurotrophin 3*, NT-3), hacen parte de la familia de factores neurotróficos, importantes durante el desarrollo del sistema nervioso y también en el mantenimiento del fenotipo maduro de muchos subtipos de neuronas

del sistema nervioso central y del periférico. Estos factores ejercen sus efectos a través de dos tipos de receptores: los de alta afinidad, que son tirosinacinasas (TrkA, TrkB y TrkC, receptores para NGF, BDNF y NT-3, respectivamente) (42) y el receptor llamado de baja afinidad (p75^{NTR}, 75 kDa *neurotrophin receptor*) que une con igual afinidad a estas neurotrofinas y que de manera contraria a los efectos de supervivencia y diferenciación inducida a través de los receptores Trk, tiene un efecto proapoptótico sobre algunas neuronas, pues tiene un dominio citoplasmático de muerte celular programada. Sin embargo, el primer papel definido para este receptor, fue el de modular la unión de las neurotrofinas a los receptores Trk de alta afinidad (43).

En un reporte reciente (44) se postuló la participación de p75^{NTR} como receptor para el virus de la rabia. Los experimentos se realizaron usando células de insecto (Sf21) transfectadas con el gen para la glicoproteína del virus rábico. Una vez que la glicoproteína se expresaba en la superficie de las células, se demostró que éstas se unían con alta afinidad a una línea celular de neuroblastoma (NG108), pero no a las células fibroblásticas control BHK y COS7. Usando las células Sf21 transfectadas, se hizo la búsqueda de un clon de células que las uniera con alta afinidad. Para esto, se expresó en COS7 un sinnúmero de genes provenientes del neuroblastoma NG108. De los muchos clones COS7 que expresaban proteínas de NG108, se identificó un clon que unía tanto la glicoproteína viral expresada en células Sf21 como al virus silvestre. A través de esta aproximación, se pudo aislar y caracterizar el gen codificante para la proteína p75^{NTR} e identificarlo como el responsable de esta unión.

Las células BHK-21 que son naturalmente muy susceptibles a la infección por cepas virales adaptadas y resistentes a las cepas de virus silvestre, fueron transfectadas con el cADN para p75^{NTR} (BHK-p75) y, luego, inoculadas con una cepa de virus salvaje. Se encontraron aproximadamente 50 veces más células infectadas en las BHK-p75 que en los controles y se convirtió una línea celular naturalmente resistente en susceptible a la infección por virus salvaje. En estas mismas células, se disminuyó en 9,35 y 52% la

proporción de células infectadas al hacer un pretratamiento con 10,33 y 100 nM de NGF, respectivamente, según los autores, por presentarse una competencia entre el virus y el NGF. De acuerdo con esta evidencia, se puede plantear que las cepas adaptadas de virus y las cepas salvajes se comportan de diferente manera durante la adsorción a las células blanco *in vitro*, lo que indica diferencias grandes entre las cepas, dependiente del proceso de adaptación al que se les someta. La evidencia bioquímica por coimmunoprecipitación de la interacción entre la glicoproteína viral y el receptor p75^{NTR} no es suficiente para explicar la infección en las células transfectadas con el receptor, pues al usar una cepa de virus adaptada (CVS), las proporciones de infección fueron iguales en las células transfectadas y en las células control.

Evidencia presentada recientemente por nuestro grupo (45), ha mostrado que es posible modular la infección en neuronas sensoriales *in vitro*, al usar los factores neurotróficos NGF y NT-3. En primer lugar, se encontró una reducción significativa en la proporción de neuronas infectadas al usar concentraciones menores a 0,5 nM de NGF (2 y 10 ng/ml) y NT-3 (1 y 5 ng/ml). Adicionalmente, al hacer el análisis morfométrico de las neuronas infectadas en cada uno de los casos, se detectaron cambios en el perfil de éstas; por ejemplo, en los cultivos tratados con NGF 10 ng/ml se inhibió principalmente la infección de las neuronas más pequeñas (menores de 20 μ m) mientras que al hacer el tratamiento con 5 ng/ml, de NT-3, se produjo una disminución significativa de la infección en las neuronas mayores de 25 μ m. Esto puede explicarse por la reconocida heterogeneidad bioquímica y morfológica de las neuronas presentes en los ganglios y en los cultivos provenientes de ellos (46). Con esta evidencia, se puede sugerir una eventual participación de p75^{NTR}, pero también podrían estar implicados los receptores Trk, pues la subpoblación de neuronas en la que se inhibió la infección con NGF es reconocida portadora de receptores TrkA para NGF pero no de receptores TrkC para NT-3 y viceversa; la subpoblación de neuronas grandes poseen TrkC pero no TrkA (47). A pesar de que p75^{NTR} se expresa de manera intensa en las células de

Schwann, los ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio nos indican que los cultivos enriquecidos de estas células se infectan en una bajísima proporción, lo que podría descartar una participación individual de esta molécula como receptor para el virus de la rabia, incluso teniendo en mente que estas células también expresan NCAM. Esto permite proponer la existencia de otra molécula, aún no definida, que une al virus previa o simultáneamente para formar un complejo receptor de alta especificidad en las neuronas.

En un estudio realizado *in vivo* por Jackson y Park, en animales transgénicos deficientes en la proteína p75^{NTR}, se encontró que no hay cambios en la entrada, la propagación y el curso de la enfermedad en estos animales comparados con los ratones parentales (48), lo que dificulta un poco la comprensión del verdadero papel de este receptor en la patogenia de la infección *in vivo* por virus de rabia adaptado.

Conclusiones

Los mecanismos moleculares de la adsorción viral son comunes a muchos virus. La identificación de éstos y un conocimiento más profundo de las interacciones entre el virus de la rabia y las neuronas, sin duda ayudará a la planeación y propuesta de nuevas terapias alternas en una enfermedad en la cual, una vez instaurada la infección en el sistema nervioso, conduce inevitablemente a la muerte.

Como se anotó anteriormente, el neurotropismo casi estricto del virus de rabia en las infecciones *in vivo*, puede explicarse por la existencia de uno o varios receptores virales en la superficie de las células nerviosas, que unen específicamente al virus y promueven su penetración y la infección de la célula blanco. De todas maneras, la sola evidencia bioquímica de adsorción no define una molécula como receptor celular para un virus; se requiere evaluar también la promoción de la infección y la evaluación de la replicación y la producción virales en cada sistema.

A partir de la evidencia recopilada en este texto, se pueden proponer algunas ideas para explicar el comportamiento del virus de rabia tanto *in vivo* como *in vitro*.

- Una idea cada vez más aceptada entre los investigadores del tema es que la entrada del virus de la rabia en las células ocurre no a través de una sola molécula, sino usando un conjunto de moléculas, simultánea o secuencialmente. Así, se puede interpretar el hecho de que las inhibiciones reportadas en todos los trabajos, sean parciales. La existencia de correceptores, uno de los cuales une al virus y, luego, le induce cambios a éste o a las moléculas vecinas en la célula para producir un verdadero receptor que promueve la infección, es un fenómeno conocido para otros virus. Se ha propuesto, que el virus de la rabia podría utilizar, al menos, dos moléculas para infectar eficazmente las células blanco; de una parte, un receptor con baja afinidad o poco específico (la fosfatidilserina, por ejemplo) y, posteriormente, utilizaría otras moléculas con mayor especificidad (por ejemplo, NCAM para CVS-BHK), en donde tanto la afinidad como la concentración de la molécula en determinados sitios pudiera explicar el neurotropismo de este virus adaptado *in vivo* y su promiscuidad *in vitro* (49). De todas maneras, aún no está claro si el virus de la rabia usa un receptor principal y otras moléculas como receptores accesorios o si puede usar indistintamente las moléculas propuestas con mayor o menor eficacia. El uso de más de un receptor es una estrategia de algunos virus con el fin de escaparse a la exigencia restrictiva del huésped y del órgano blanco.
- Otra posibilidad es que el virus use diferentes receptores para cada uno de los estados de la enfermedad. Es decir, el virus puede requerir en la periferia receptores de alta afinidad o altamente concentrados para ser capturado por las terminaciones nerviosas sensoriales o en la placa neuromuscular y, luego, después de ser transportado hasta el SNC, usar moléculas dispuestas más ubicuamente para su proceso de dispersión y saltos transinápticos. No está claro si los receptores proteicos hasta hoy caracterizados (RNACH, NCAM y p75^{NTR}), requieren estar juntos en el sitio de la captura o, si por su distribución particular, constituyen vías de entrada diferentes.

- Existen muchas dificultades para homologar los experimentos de cada grupo, pues las cepas de virus adaptadas infectan muchos tipos de líneas celulares de mamíferos, mientras que las cepas salvajes sólo infectan líneas celulares neuronales; por tanto, la identificación de un receptor para el virus de rabia ha sido más difícil que para otros virus. Adicionalmente, las condiciones experimentales *in vitro* no siempre son extrapolables a los eventos *in vivo*, pues en los primeros, las células se encuentran sin las barreras naturales y, además, se usan altas concentraciones de virus, que le dan mayor relevancia a los mecanismos de adsorción inespecíficos que pueden no ser importantes *in vivo*. Hoy se reconoce que las cepas del virus de rabia adaptadas en el laboratorio, al ser forzadas a un ambiente *in vitro* menos restrictivo, comienzan a usar una serie de receptores menos específicos; esto también se ha demostrado para el virus del sarampión, cuyas cepas vacunales usan un receptor diferente al que usan las cepas salvajes (50).
- Para otros virus, se ha demostrado la existencia de proteínas que promueven la entrada a la célula huésped pero que no actúan como moléculas de anclaje (receptores). Es el caso de los adenovirus que se unen a su célula blanco y, después, una molécula diferente (la vitronectina) actuando como un factor de entrada accesorio promueve la entrada y la invasión del virus (sin participar en la adsorción) (51,52). Igual argumento se plantea para el HIV, para explicar porqué los linfocitos murinos CD4+ se unen al virus pero no producen una infección similar a la que ocurre en los primates, lo que ha permitido proponer la existencia de un factor accesorio de entrada que sólo está presente en las especies susceptibles a la infección por este retrovirus (53). Ante la evidencia de la participación de los RNACH, NCAM y p75^{NTR} en la infección por el virus rábico, se podría proponer que uno u otro estuvieran actuando como factor accesorio de entrada, definiendo de esta manera que solamente en las células (neuronas) que poseen la combinación adecuada se produce la infección.

- Definitivamente, los eventos de adsorción del virus de la rabia a su célula huésped, que definen en gran parte su tropismo, pueden explicar algunas facetas de la patogenia de la infección, pero de todas maneras quedan vacíos conceptuales. ¿Existen sólo determinados grupos celulares que admiten al virus durante la infección primaria? ¿Cuáles son los mecanismos para la dispersión de la progenie viral a través de otros tejidos no relacionados directamente con el SNC, como las glándulas salivares, la piel, la córnea o el tejido graso?

La explicación de los eventos moleculares que subyacen a la infección y al tropismo viral son de por sí un problema importante e interesante, pero son aún más relevantes y pertinentes cuando se requiere identificar con urgencia los posibles puntos del ciclo viral para el desarrollo de nuevos agentes antivirales. El bloqueo completo de la adsorción, la penetración o el desnudamiento, por ser las etapas iniciales, son los puntos más convenientes para prevenir las enfermedades virales, sin causar los eternos problemas de adaptación y resistencia en los antivirales de uso actual.

Referencias

1. Plotkin S. Rabies. Clin Infect Dis 2000;30:4-12.
2. Baer GM, Shanta TR, Bourne GH. The pathogenesis of street rabies virus in rats. Bull World Health Org 1968; 38:119-25.
3. Charlton K, Nadin-Davis S, Casey G, Wandeler A. The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. Acta Neuropathol 1997;94:73-7.
4. Fishbein D, Robinson L. Current concepts in rabies. N Eng J Med 1993;329:1632-38.
5. Jackson A, Ye H, Phelan C, Ridaura-Sanz C, Zheng Q, Li Z, Wan X, López-Corella. Extraneural involvement in human rabies. Laboratory Invest 1999;79:945-51.
6. Wunner WH, Larson JK, Dietzchold B, Smith CL. The molecular biology of rabies viruses. Rev Infect Dis 1988;10:771-8.
7. Anilionis A, Wunner W, Curtis P. Structure of glycoprotein gene in rabies virus. Nature 1981;294:275-8.
8. Gaudin Y, Ruigrok R, Tuffereau C, Knossow M, Flammand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. Virology 1992;187:627-32.

9. **Dietzchold B, Rupprecht C, Fang-Fu Z, Koprowski H.** Rhabdoviruses. En: Fields B, Knipe D, Howley R, editors. *Field's virology*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 1137-59.
10. **Wunner W, Reagan K, Koprowsky H.** Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *J Virol* 1984;50:691-97.
11. **Castellanos JE, Hurtado H, Arias JC, Velandia A.** Rabies virus infection of cultured adult mouse dorsal root ganglion neurons. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91:621-5.
12. **Castellanos JE, Hurtado H.** Viral infection studied in adult sensory neurons. En: Haynes L, editor. *The neuron in tissue culture*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1999. p. 289-93.
13. **Haywood A.** Virus receptor: binding, adhesion, strengthening and changes in viral structure. *J Virol* 1994;68:1-5.
14. **Brougham J, Wunner W.** Characterization of protein involvement in rabies virus binding to BHK-21 cells. *Arch Virol* 1995;140:75-93.
15. **Superti F, Hauttecoeur B, Morelec M, Goldono P, Bizzini B, Tsiang H.** Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J Gen Virol* 1986;67:47-56.
16. **Conti C, Hauttecoeur B, Morelec MJ, Bizzini, Orsi N, Tsiang H.** Inhibition of rabies virus infection by a soluble membrane fraction from the rat central nervous system. *Arch Virol* 1988;98:73-86.
17. **Conti C, Tsiang H.** Effects of concavalin A on the early events of rabies virus infection of CER cells. *Intervirology* 1985;24:166-9.
18. **Conti C, Tsiang H, Superti F.** Membrane carbohydrates requirement for rabies virus binding to chicken embryo related cells. *Intervirology* 1986;26:164-8.
19. **Tsiang H, Koulakoff A, Bizzini B, Berwald-Netter Y.** Neurotropism of rabies virus on *in vitro* study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983;42:439-52.
20. **Puri A, Grimaldi S, Blumenthal R.** Role of viral envelope sialic acid in membrane fusion mediated by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* 1992;31:10108-13.
21. **Thoufouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M.** The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* 1998; 72: 7181-90.
22. **Lentz T, Burrage T, Smith A, Crick J, Tignor G.** Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 1982;215:182-4.
23. **Lentz T, Wilson P, Hawrot E, Speicher O.** Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venoms curaremimetic neurotoxin. *Science* 1984;226:847-8.
24. **Lentz T, Hawrot E, Wilson P.** Synthetic peptides corresponding to sequences of snake venom neurotoxins and rabies virus glycoprotein bind to the nicotinic acetylcholine receptor. *Protein Struct Funct Genetics* 1987;2: 298-307.
25. **Donnelly-Roberts D, Lentz T.** Structural and conformational similarity between synthetic peptides of curaremimetic neurotoxins and rabies virus glycoprotein. *Mol Brain Res* 1991;11:107-13.
26. **Bracci L, Antoni G, Cusi M, Lozzi L, Nicolai N, Petreni S, et al.** Antipeptide monoclonal antibodies inhibit the binding of rabies virus glycoprotein and alpha bungarotoxin to the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Immunol* 1988;25:881-8.
27. **Lentz T.** Structure-function relationships of curaremimetics neurotoxins loop 2 and of a structurally similar segment of rabies virus glycoprotein in their interaction with nicotinic ACh-R. *Biochemistry* 1991;30:10949-57.
28. **Gastka M, Horvath J, Lentz T.** Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *J Gen Virol* 1996;77:2437-40.
29. **Hanham C, Zhao F, Tignor G.** Evidence from the antiidiotypic network that the ACh-R is a rabies virus receptor. *J Virol* 1993;67:530-542.
30. **Lentz T, Fu Y, Lewis P.** Rabies virus infection of IMR-32 human neuroblastoma cells and effect of neurochemical and other agents. *Antiviral Res* 1997;35:29-39.
31. **Burrage T, Tignor G, Smith A.** Rabies virus binding at neuromuscular junctions. *Virus Res* 1985;3:273-89.
32. **Baer GM, Shaddock J, Quirion R, Dam T, Lentz TL.** Rabies susceptibility and acetylcholine receptor. *Lancet* 1990;335:664-5.
33. **Tsiang H, Dela Porte S, Ambroise J, Derer M, Koenig J.** Infection of cultured rat myotubes and neurons from *spinal cord by rabies virus*. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986;45:28-42.
34. **Castellanos JE, Castañeda D, Velandia A, Hurtado H.** Partial inhibition of the *in vitro* infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neurosci Lett* 1997;216:198-200.
35. **Castellanos JE, Castañeda D, Hurtado H, Velandia A.** Agonistas nicotínicos inhiben la infección por virus de rabia obtenido en cerebro de ratón pero no por virus adaptado a células. *Biomédica* 1997;17:66-7.
36. **Benito MA, Ramírez R.** Efecto del tratamiento crónico con agonistas nicotínicos en la infección *in vitro* por virus de rabia en neuronas sensoriales de ratón adulto (tesis). Bogotá: Universidad Distrital; 2000.
37. **Reagan K, Wunner H.** Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor. *Arch Virol* 1985;84:277-82.

38. **Castellanos JE, Benito MA, Ramírez R.** Receptores nicotínicos neuronales. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional* 2001 (en prensa).
39. **Schuch U, Lohse MJ, Schachner M.** Neuronal cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 1989;3:3-20.
40. **Schachner M.** Neural recognition molecules in disease and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:726-34.
41. **Lafon M, Lafage M, Thoulouze MI, Préhaud C, Castellanos J, Durbec P, et al.** NCAM, the neural cell adhesion molecule is a major receptor used by rabies virus strains to infect neurons. *J Neurovirol* 2000;6:449-50.
43. **Batleman D, Geller A, Chao M.** HSV-1 vector mediated gene transfer of the human nerve growth factor receptor p75NGFR defines high affinity NGF binding. *J Neurosci* 1993;13:941-51.
42. **Suter U, Angst C, Tien C, Drinkwater C, Lindsay R, Shooter E, et al.** NGF/BDNF chimeric proteins: analysis of neurotrophin specificity by homolog-scanning mutagenesis. *J Neurosci* 1992;12:306-18.
44. **Tuffereau C, Bénéjean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A.** Low-affinity nerve growth factor receptor (p75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J* 1998;17:7250-9.
45. **Castellanos JE, Martínez M, Hurtado H, Acosta O.** Nerve growth factor and neurotrophin-3 modulates the rabies infection of adult sensory neurons in primary cultures. *Brain Res* 2000;871:120-6.
46. **Martínez M, Quiroga N, Castellanos JE, Hurtado H.** Subpoblaciones neuronales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomédica* 2000;20:248-60.
47. **Kashiba H, Nogushi K, Yoshihido U, Senba E.** Coexpression of Trk family members and low-affinity neurotrophin receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Mol Brain Res* 1995;30:158-64.
48. **Jackson A, Park H.** Experimental rabies virus infection of p75 neurotrophin receptor-deficient mice. *Acta Neuropathol* 1999b;98:641-44.
49. **Thoulouze MI, Lafon M.** Les recepteurs du virus de la rage. *Virologie* 2000;4:39-48.
50. **Bartz R, Firshing R, Rima B, Ter Meulen V, Scheider-Schaulies J.** Differential receptor usage by measles virus. *J Gen Virol* 1998;79:1015-25.
51. **Wickham T, Mathias P, Cheresch D, Nemerow G.** Integrins avb3 and avb5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993;73:309-20.
52. **Nemerow GR.** Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology* 2000;274:1-4.
53. **Weiss R.** Human receptor for retroviruses. En: Wimmer E, editor. *Cellular receptors for animal viruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. p. 15-32.