Biomédica 2013;33:564-73
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.1552

ARTÍCULO ORIGINAL

Distribución de calbindina y parvoalbúmina y efecto del virus de la rabia sobre su expresión en la médula espinal de ratones

Jeison Monroy-Gómez, Orlando Torres-Fernández

Laboratorio de Microscopía, Grupo de Morfología Celular, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Aunque se trata de una enfermedad infecciosa del sistema nervioso, poco se conoce sobre los mecanismos patogénicos de la infección con el virus de la rabia. En particular, son escasos los estudios sobre su histopatología en la médula espinal.
Objetivo. Estudiar la distribución de las proteínas calbindina y parvoalbúmina, en la médula espinal de ratones y evaluar el efecto de la infección con el virus de la rabia sobre su expresión.
Materiales y métodos. Se inocularon ratones con virus de la rabia, por vía intracerebral o intramuscular, y se extrajo la médula espinal para hacer cortes transversales, los cuales se sometieron a tratamiento inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales para revelar la presencia de las dos proteínas en ratones normales y en animales infectados. Se llevó a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo de la inmunorreacción de las dos proteínas.
Resultados. Las proteínas calbindina y parvoalbúmina se distribuyeron de manera diferencial en las láminas de Rexed. La infección con el virus de la rabia produjo una disminución en la expresión de calbindina. Por el contrario, la infección provocó un incremento en la expresión de parvoalbúmina. El efecto de la rabia sobre las dos proteínas fue similar al comparar las dos vías de inoculación.
Conclusión. El efecto diferencial de la infección con el virus de la rabia sobre calbindina y parvoalbúmina en la médula espinal de ratones, es similar al reportado anteriormente para áreas encefálicas. Esto sugiere uniformidad en su respuesta a la infección en todo el sistema nervioso central y es un aporte importante para el conocimiento de la patogénesis de la rabia.

Palabras clave: virus de la rabia, médula espinal, neuronas, ratones, inmunohistoquímica.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.1552

Calbindin and parvalbumin distribution in spinal cord of normal and rabies-infected mice

Introduction: Rabies is a fatal infectious disease of the nervous system; however, the knowledge about the pathogenic neural mechanisms in rabies is scarce. In addition, there are few studies of rabies pathology of the spinal cord.
Objective: To study the distribution of calcium binding proteins calbindin and parvalbumin and assessing the effect of rabies virus infection on their expression in the spinal cord of mice.
Materiales y methods: Mice were inoculated with rabies virus, by intracerebral or intramuscular route. The spinal cord was extracted to perform some crosscuts which were treated by immunohistochemistry with monoclonal antibodies to reveal the presence of the two proteins in normal and rabies infected mice. We did qualitative and quantitative analyses of the immunoreactivity of the two proteins.
Results: Calbindin and parvalbumin showed differential distribution in Rexed laminae. Rabies infection produced a decrease in the expression of calbindin. On the contrary, the infection caused an increased expression of parvalbumin. The effect of rabies infection on the two proteins expression was similar when comparing both routes of inoculation.
Conclusion: The differential effect of rabies virus infection on the expression of calbindin and parvalbumin in the spinal cord of mice was similar to that previously reported for brain areas. This result suggests uniformity in the response to rabies infection throughout the central nervous system. This is an important contribution to the understanding of the pathogenesis of rabies.

Keywords: Rabies virus, spinal cord, neurons, mice, immunohistochemistry.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.1552

Contribución de los autores:
Jeison Monroy-Gómez: planeación y diseño del trabajo; desarrollo de los experimentos, análisis de resultados, elaboración de borrador del manuscrito y revisión final.
Orlando Torres-Fernández: idea, planeación, diseño y dirección general del trabajo; análisis de resultados, revisión y versión final del manuscrito.

La rabia es una zoonosis que genera una encefalomielitis fatal en los mamíferos. Si bien las medidas de prevención para evitar muertes por rabia están bien descritas y desarrolladas, las defunciones alcanzan las 55.000 al año en todo el mundo, aunque es posible que haya subregistro en el número de casos (1). La incidencia en cada país es un reflejo del grado de exposición frente a los animales infectados y la disponibilidad de recursos. La rabia continúa siendo un problema serio de salud pública en países pobres con acceso limitado a tratamientos preventivos y con pocos centros de diagnóstico y sistemas de vigilancia (2,3).

La enfermedad está presente en todos los continentes (excepto la Antártida), en más de 106 países. La mayoría de las muertes humanas (más del 95 %) se registran en África y Asia (1). En orden de importancia, los vectores son los perros (54 %), otros mamíferos terrestres (42 %) y los murciélagos (4 %) (2,4). La rabia canina constituye una amenaza potencial para más de 3.300 millones de personas en Asia y África; el mayor riesgo lo corren quienes viven en zonas rurales donde no hay disponibilidad o facilidad de acceso a las vacunas e inmunoglobulinas humanas (4).

Aunque la rabia ha sido una enfermedad conocida desde la antigüedad y bastante estudiada desde el enfoque epidemiológico, aún se desconocen muchos aspectos de su patogénesis, en particular, de la fisiopatología en el sistema nervioso, su tejido blanco. Así, por ejemplo, la ruta exacta de ingreso y diseminación de la infección viral aún no está plenamente descifrada. Existe evidencia para afirmar que después del contacto con un animal infectado, el virus de la rabia se fija a células nerviosas o musculares en el sitio de inoculación (5). Luego de varios días o meses, las partículas virales ingresan por el sistema nervioso periférico y se diseminan al sistema nervioso central. Ocasionalmente, el virus puede llegar directamente al sistema nervioso central sin replicarse en los músculos(6). Las partículas virales ingresan a las células nerviosas por endocitosis, en la terminal sináptica de la placa neuromuscular, y viajan a través de los tractos nerviosos por medio del transporte axonal retrógrado (2,5); así logran invadir la médula espinal y posteriormente el encéfalo (7).

Correspondencia:
Orlando Torres-Fernández, Laboratorio de Microscopía, Grupo de Morfología Celular, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1262
otorresf@ins.gov.co

Recibido: 24/01/13; aceptado:31/05/13

Existen moléculas que actúan como marcadores neuronales; esto significa que pueden ser utilizadas para identificar tipos de neuronas o poblaciones neuronales. Previamente hemos estudiado cambios inducidos por el virus de la rabia en el encéfalo mediante la utilización de tres proteínas de enlace del calcio (*Calcium Binding Protein*, CaBP): calbindina (CB), calretinina (CR) y parvoalbúmina (PV). El conocimiento de la localización, expresión y mecanismo de acción de estas proteínas, ha sido importante en estudios histológicos, inmunohistoquímicos e histopatológicos del sistema nervioso, ya que se expresan diferencialmente en determinadas subpoblaciones neuronales. Su utilidad se ha demostrado en diversas especies de vertebrados, especialmente en mamíferos (8-11).

La alta solubilidad de las CaBP les permite estar presentes en todo el citosol, aun en dendritas distales y en axones, incluyendo los botones sinápticos (9). Los anticuerpos contra CB, CR y PV son instrumentos adecuados para describir algunas características de los componentes estructurales del sistema nervioso y sus transformaciones durante el desarrollo, así como para detectar variaciones específicas en muestras patológicamente alteradas (10,11). Además, las CaBP son una alternativa para estudiar neuronas GABA-érgicas en la corteza cerebral (11,12).

Los estudios de marcadores neuronales (12-14), algunos neurotransmisores (15,16) y, en general, en la mayoría las investigaciones de la histopatología del virus de la rabia, se han enfocado en el efecto de la infección sobre el encéfalo. Los trabajos publicados sobre la patogénesis de la rabia que incluyen a la médula espinal son relativamente escasos, a pesar de ser la primera estructura del sistema nervioso central infectada por el virus debido a su conexión directa con los músculos. El conocimiento del efecto del virus sobre las poblaciones neuronales de la médula espinal es de gran importancia para diseñar estrategias que permitan bloquear la entrada y diseminación del virus. El propósito de este trabajo fue estudiar la distribución de CB y PV en la médula espinal de ratones, y evaluar el efecto de la infección con el virus de la rabia sobre la expresión de estas proteínas.

Materiales y métodos

Manejo de animales e inoculación del virus de la rabia

El estudio se llevó a cabo en ratones ICR (hembras de cuatro semanas), confinados en una sala de

alta seguridad biológica para agentes infecciosos, del Bioterio del Instituto Nacional de Salud, en condiciones ambientales y nutricionales, de acuerdo con normas éticas nacionales e internacionales exigidas para la investigación con animales de laboratorio (Ley 84 de 1989 y resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud) y aprobadas por el comité de ética del Instituto. Para la infección se utilizaron alícuotas de virus de la rabia de la cepa CVS (*Challenge Virus Standard*) suministrado por el Laboratorio de Virología del Instituto. El virus fue reproducido a partir del macerado de cerebros de ratones lactantes infectados por vía intracerebral y fue titulado por diluciones seriadas (título=$10^{10.49}$) (17) (17).

La experimentación se llevó a cabo mediante dos vías de inoculación, intracerebral e intramuscular. Para la vía intracerebral se utilizaron dos grupos de cinco animales cada uno. En el primer grupo, cada animal fue inoculado con 0,03 ml de una de las alícuotas con diluciones virales $1x10^{-6}$, equivalente a $10^{4.49}$DL50 y, en el grupo control, los animales se inocularon con la solución diluyente, sin el virus. La inyección se hizo a través del hueso parietal con una aguja muy fina (número 27) para minimizar el daño al tejido cerebral. Un grupo de cinco animales se inocularon por vía intramuscular, cada uno con 0,03 ml de una de las alícuotas con diluciones virales $1x10^{-1}$, equivalentes a $10^{9.49}$DL50 y, el grupo control, con igual cantidad de solución diluyente, sin el virus. La inyección se llevó a cabo en las extremidades posteriores, en la parte posterior del muslo, entre los músculos semitendinoso y semimembranoso. Los animales se mantuvieron en observación durante los días siguientes y se tomó nota de la sintomatología y cambios de conducta hasta que se decidió terminar el experimento como se describe a continuación.

Preparación de tejidos

Los animales enfermos y sus controles se sacrificaron cuando los primeros manifestaron síntomas avanzados de la enfermedad (96 horas después de la inoculación intracerebral) y (144 horas después de la inoculación intramuscular). Cada animal se anestesió con 0,2 ml de hidrato de cloral al 30 %, suministrado por vía intraperitoneal (350 mg/kg), dejando que el compuesto hiciera efecto por tres minutos, durante los cuales los animales estuvieron bajo anestesia profunda. Con los animales anestesiados, se llevó a cabo la fijación por perfusión intracardiaca. Inicialmente, se dejó correr tampón salino de fosfatos (PBS) a un pH de 7,3, durante tres minutos, (aproximadamente 30 ml) y luego la solución de paraformaldehído al 4% como fijador, durante 10 minutos (aproximadamente, 100 ml). Después de completar la perfusión con el fijador, nuevamente se dejó circular PBS por un minuto.

Una vez terminada la perfusión, se extrajo la columna vertebral de cada ratón. Las columnas se preservaron en paraformaldehído al 4 % hasta el momento de llevar a cabo la extracción de la médula espinal (15). Para la extracción de la médula las columnas se descalcificaron en una solución de ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) al 10 % (diluido en agua destilada) por 24 horas; posteriormente, las médulas se incluyeron en agar diluido en agua destilada al 3 a 4 % para poder cortarlas en un vibrátomo en un tiempo menor de tres horas después de la inclusión.

Inmunohistoquímica

Se estudiaron secciones transversales de la médula espinal cervical (C1-C7). Se hicieron series de cortes en vibrátomo, de 50 µm de espesor. Estos se recogieron en cajas de Petri pequeñas (2,5 cm de diámetro) que contenían PBS, donde los cortes permanecieron en flotación y agitación constante, a temperatura ambiente (20 °C). Los cortes se pretrataron con cloruro de amonio (NH_4Cl_2) 0,05M por 30 minutos, para retirar los residuos de aldehídos, y con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3 %, para bloquear la peroxidasa endógena. Para bloquear los sitios de inmunorreacción inespecífica, se utilizó una solución compuesta por suero normal de caballo, tritón y albumina sérica bovina.

Para la detección de antígenos virales se incubaron los cortes con un anticuerpo policlonal anti-rabia previamente elaborado y su protocolo de uso publicado por el grupo (18). La detección inmunohistoquímica de CB y PV se hizo incubando los cortes con anticuerpos monoclonales anti-CB o anti-PV (Sigma). Posteriormente, se hizo la incubación de los cortes en un anticuerpo secundario anti-conejo (Sigma) y el tratamiento posterior con el complejo ABC (Vector). Para el revelado de CB y PV, se utilizó un kit de DAB-Níquel (Vector), y para la detección inmunohistoquímica de antígenos de rabia, se reveló sólo con diamino-bencidina. Los detalles de estos procedimientos se han descrito previamente (13-16).

Análisis cuantitativo

Inicialmente se llevaron a cabo observaciones cualitativas de las preparaciones inmunohistoquí-

micas para las CaBP en el material tomado del grupo control, para reconocer la presencia de células positivas para CB y PV, y tomar nota de la distribución y sus características morfológicas en condiciones normales. De igual forma, se observaron los resultados de la inmunohistoquímica de rabia para confirmar la presencia de antígenos virales en el grupo en el cual se inoculó el virus.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, se tomaron los cinco casos de animales infectados (unidades experimentales) con sus respectivos controles. En cada unidad experimental se seleccionarán cinco cortes (repeticiones) para contar las células inmunorreactivas para CB y PV en los cortes transversales de médula espinal, con un micrómetro de malla Netzmiier de 1 mm^2; estos conteos se hicieron con el objetivo 10X del microscopio. Se digitalizaron imágenes de los cortes en el programa CAPTURE PRO 6 y se utilizó el programa Image J para el análisis de la densitometría óptica de las reacciones inmunohistoquímicas (para medir la intensidad de las inmunotinciones para CB y PV). Los datos se analizaron mediante la prueba de distribución de Wilcoxon-Mann-Whitney (estadística no paramétrica) (13,15,19).

Resultados

Manifestaciones clínicas y diagnóstico de la enfermedad

Los primeros síntomas de la infección en los animales infectados por vía intracerebral, se observaron a partir de las 48 horas después de la inoculación; los ratones presentaban encorvamiento y pelo erizado. Posteriormente, manifestaron emaciación y ataxia. En los animales inoculados por vía intramuscular, los primeros síntomas de la enfermedad se observaron a las 96 horas después de la inoculación y se caracterizaron por disminución progresiva del movimiento a medida que avanzaba la enfermedad. Además, los animales presentaron temblor y parálisis en una o las dos patas traseras, hasta llegar a la postración total. La infección rábica de la médula espinal por las dos vías de inoculación se confirmó mediante diagnóstico inmunohistoquímico en las dos regiones de estudio. Los antígenos virales se diseminaron por todo el citoplasma y las dendritas, de tal manera que se demarcó muy bien la morfología neuronal. Además, se observaron inclusiones intracitoplásmicas (cuerpos de Negri) abundantes en el soma y las dendritas (figura 1).

Distribución de CB y PV en la médula espinal

Se demostró la presencia de CB y PV mediante inmunolocalización en todos los segmentos de la médula espinal objeto de estudio (C1-C7). La marcación permitió describir en detalle la morfología de los cuerpos celulares, las dendritas y los axones, tanto en las células positivas para CB como en aquellas positivas para PV. Hubo una clara diferencia en la localización de estas dos proteínas en las diferentes regiones de la médula espinal (asta dorsal, región ventromedial y asta ventral) y en las diez láminas en las que se subdivide la sustancia gris (láminas de Rexed). La mayor densidad de neuronas positivas para CB se concentró en las láminas I y II. En estas dos láminas se observó

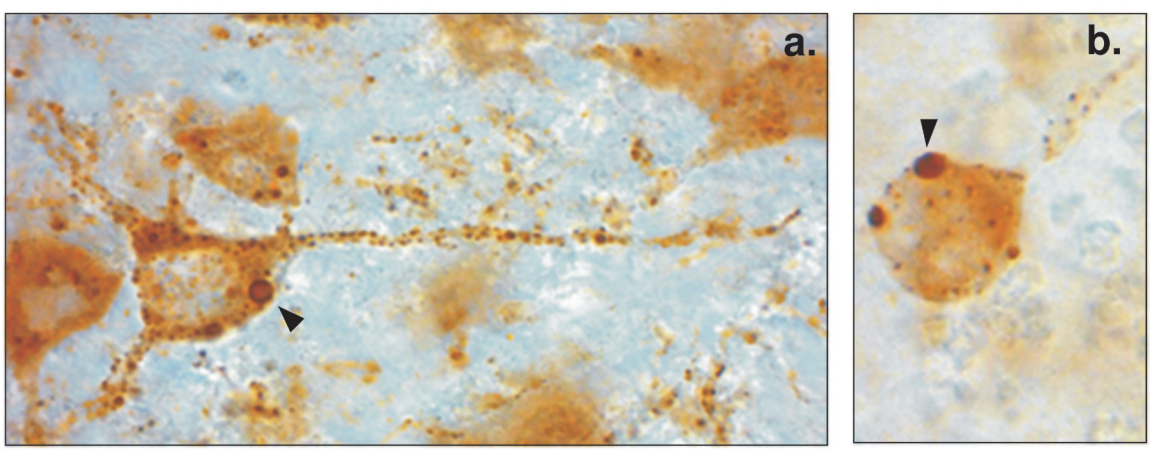

Figura 1. Inmunorreacción para rabia en neuronas de la médula espinal cervical de ratones. Los antígenos virales diseminados por el pericarion (citoplasma) permiten demarcar la morfología neuronal completa. Son evidentes las inclusiones virales con características de cuerpo de Negri (flechas) y otras inclusiones numerosas de menor tamaño. **a.** Neurona motora del asta ventral. **b.** Neurona del asta dorsal (100X). Revelado con diamino-bencidina.

escasa presencia de células positivas para PV. En contraste, en la lámina III se encontraron células positivas para CB apenas ocasionalmente, mientras que las células positivas para PV se hallaron en mayor número. En las láminas V y VI, el número de neuronas inmunorreactivas fue similar para los dos tipos de proteínas. En las láminas VII, VIII y IX, la mayoría de las células fueron inmunorreactivas para PV y también fue notoria la marcación en el neuropilo. En estas láminas, las células positivas para CB revelaron una marcación menos intensa.

Efecto del virus de la rabia sobre la expresión de CB y PV en la médula espinal

Inoculación por vía intracerebral

La infección generó disminución del número de células inmunorreactivas a CB (controles: 352,3±46,94; infectados: 204,14±31,57) (p=0,0079) (cuadro 1) (figuras 2 y 3). La pérdida de inmunorreacción fue más notoria en las láminas I y II (p=0,019). Las células inmunorreactivas para PV se hallaron dispersas regularmente desde la lámina I hasta la IX, tanto en el material control como en el infectado. Se encontró un mayor número de células positivas para PV en los animales infectados, en comparación con los controles (controles: 303,76±15,84; infectados: 550,90±55,96) (p=0,015) (cuadro 1) (figuras 3 y 4).

Al comparar las muestras control con las infectadas por medio del análisis densitométrico, se halló un aumento estadísticamente significativo de la inmunorreacción para PV (p=0,0168) (cuadro 2). Por el contrario, la infección con rabia produjo una disminución en la inmunotinción de CB a nivel cervical (p=0,0216) (cuadro 2). El efecto fue particularmente evidente en las neuronas motoras.

Inoculación por vía intramuscular

El número de células inmunorreactivas a CB disminuyó en los animales infectados (controles: 299,5±46,94; infectados: 186,74±30,7) (p=0,007) (cuadro 1) (figuras 2 y 3). La pérdida de inmunorreacción fue más notoria en las láminas I y II (p=0,007) (cuadro 1). Las células inmunorreactivas para PV se hallaron dispersas regularmente desde la lámina I hasta la IX, tanto en el material control como en el infectado.Se encontró un mayor

Cuadro 1. Datos de la distribución del número promedio de células positivas para CB y positivas para PV contadas en un cuadrante de 1 mm^2 en las diferentes láminas de la médula espinal cervical de ratones (controles e infectados por vía intracerebral e intramuscular). Por cada vía de inoculación, se relacionan los promedios del número de células de cinco muestras por capa.

Calbindina						
Lámina	**Intracerebral**			**Intramuscular**		
	Control	**Infectado**	**p**	**Control**	**Infectado**	**p**
I-II	188,4 (23,7)	107,0 (25,2)	0,019**	107,1 (11,7)	71,6 (11,7)	0,007**
III	3,2 (2,98)	2,5 (1,77)	0,896	4,1 (1,90)	2,6 (1,80)	0,206
IV	20,5 (2,88)	7,5 (2,52)	0,007**	32,8 (7,80)	16,8 (9,80)	0,015**
V-VI	50,1 (10,8)	21,3 (5,97)	0,007**	51,0 (11,1)	27,4 (10,2)	0,015**
VII	18,7 (7,89)	11,5 (4,13)	0,150	28,8 (5,80)	19,1 (2,00)	0,015**
VIII	28,3 (12,0)	16,76 (3,91)	0,056	29,1 (2,30)	21,8 (4,60)	0,056
IX	54,3 (6,39)	35,34 (8,86)	0,007**	46,6 (6,30)	27,4 (4,10)	0,007**
Total*	354,3 (46,9)	204,1 (31,5)	0,007**	299,5 (33,6)	186,7 (30,7)	0,007**
Parvoalbumina						
Lámina	**Intracerebral**			**Intramuscular**		
	Control	**Infectado**	**p**	**Control**	**Infectado**	**p**
I-II	44,06 (4,56)	207,7 (14,5)	0,015**	64,80 (18,8)	114,03 (10,8)	0,015**
III	51,20 (2,53)	47,2 (2,37)	0,063	39,56 (9,30)	43,18 (3,80)	0,732
IV	40,84 (7,08)	40,0 (9,18)	0,873	36,14 (11,3)	41,80 (4,65)	0,555
V-VI	49,16 (3,01)	82,7 (19,2)	0,015**	60,98 (5,81)	75,35 (4,46)	0,015**
VII	27,12 (1,38)	46,2 (12,3)	0,015**	34,40 (11,2)	42,83 (4,75)	0,381
VIII	28,20 (7,10)	42,8 (13,2)	0,111	39,44 (3,31)	55,68 (8,56)	0,015**
IX	62,44 (3,68)	82,7 (7,39)	0,015**	53.26 (6,59)	74,10 (5,69)	0,015**
Total*	303,7 (15,8)	550,9 (55,9)	0,015**	328,6 (35,2)	447,0 (19,0)	0,015**

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

** Diferencia significativa

Entre los paréntesis están incluidas las desviaciones estándar.

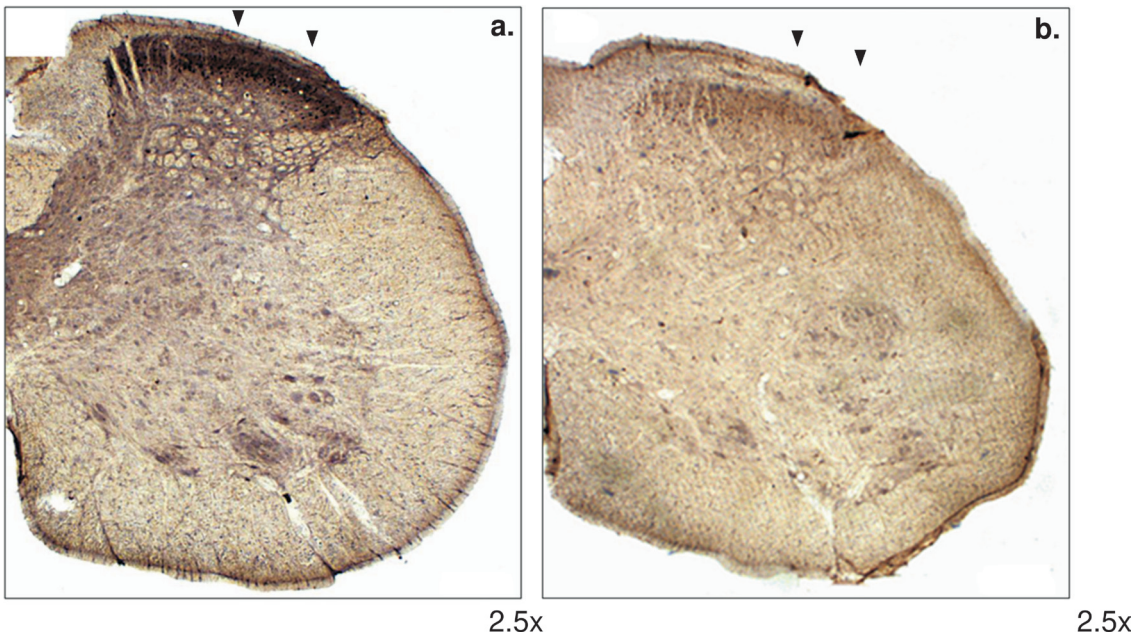

Figura 2. Inmunorreacción a CB en la médula espinal de ratones. **a.** Ratón control: obsérvese la marcación intensa en las láminas I y II del asta dorsal (flechas). **b.** Ratón infectado: se evidencia la pérdida de inmunorreacción para CB, especialmente notable en las láminas I y II (flechas) (2,5X). Revelado con diamino-bencidina-níquel.

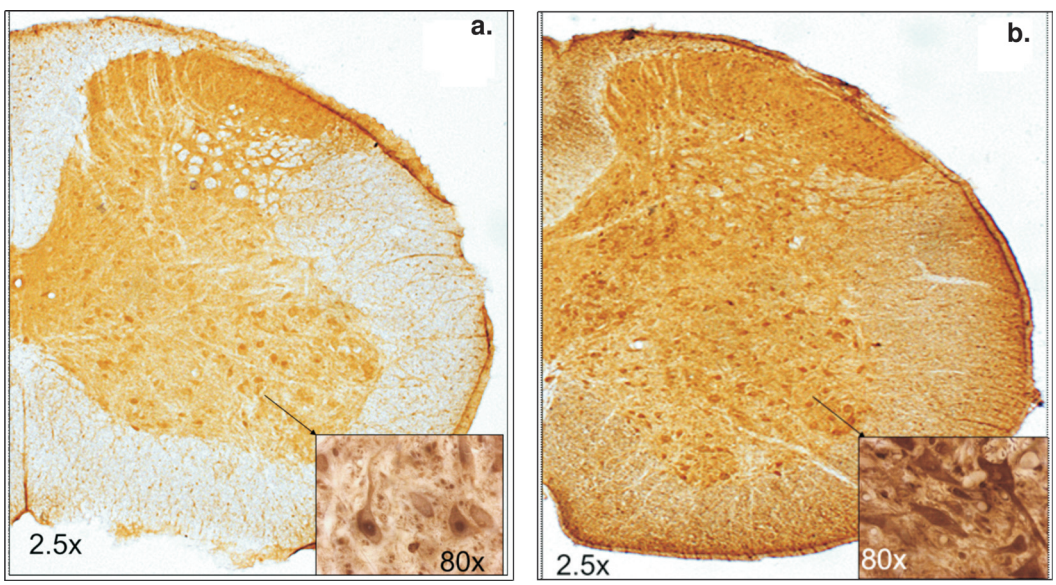

Figura 3. Inmunorreacción a PV en la médula espinal cervical de ratones. **a.** Ratón control: nótese la marcación en toda la médula espinal (diamino-bencidina). En el recuadro se amplían las neuronas motoras (diamino-bencidina -níquel). **b.** Ratón infectado: se evidencia el aumento de inmunorreacción para PV en las células y el neuropilo de la sustancia gris, así como en las fibras de la sustancia blanca periférica (diamino-bencidina). La ampliación muestra el aumento de inmunorreacción en el pericarion (diamino-bencidina -níquel).

número de células positivas para PV en los ratones infectados, en comparación con los controles (controles: 328,6±35,2; infectados: 447,0±19,0) (p=0.015) (cuadro 1) (figuras 3 y 4).

Al comparar las muestras control con las infectadas por medio del análisis densitométrico, se halló un aumento estadísticamente significativo de la inmunorreacción para PV (p=0,0079) (cuadro 2). Por el contrario, la infección con rabia produjo una disminución en la inmunotinción de CB (p=0,0159) (cuadro 2). El efecto fue muy evidente en las neuronas motoras.

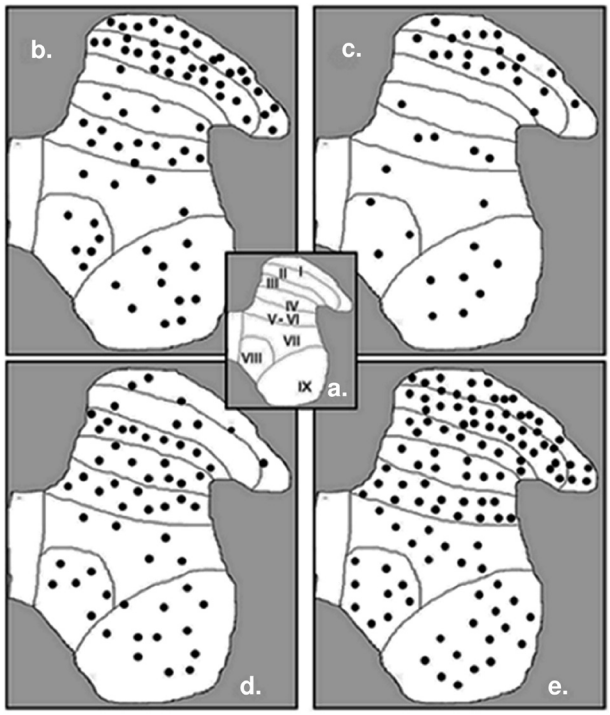

Figura 4. Representación esquemática de la distribución de las células positivas para CB y positivas para PV en las láminas de Rexed de la médula espinal en ratones control y ratones infectados con rabia por vía intramuscular. **a.** Diagrama de la distribución de las láminas de Rexed. **b.** Distribución de las células inmunorreactivas para CB en ratones control. **c.** Disminución del número de células inmunorreactivas para CB en ratones infectados. **d.** Distribución de las células positivas para PV. **e.** Aumento del número de células positivas para PV en ratones infectados. Cada círculo es equivalente a cinco neuronas. Los resultados obtenidos en animales inoculados por vía intracerebral son similares.

Discusión

Distribución de CB y PV en la médula espinal de ratones

Probablemente este sea el primer reporte de la inmunolocalización de CB y PV en la médula espinal de ratones. En general, esta distribución corresponde con las descripciones en otras especies, aunque hay algunas diferencias, entre las cuales es importante destacar las que se encontraron al compararla con la distribución en ratas, su pariente filogenético más cercano (20).

En nuestro estudio del asta dorsal de ratón, las láminas I y II son las que presentan mayor inmunorreacción de CB y, ocasionalmente, se observan neuronas positivas en la III; esto es similar a lo hallado en otras especies (8,20-22). Sin embargo, al evaluar la presencia de células positivas para PV en el asta dorsal del ratón, se observó marcación en las láminas I y II, lo que no concuerda con los reportes previos en ratas y otros mamíferos, ya que se ha descrito su presencia sólo en la margen inferior de la lámina II y, por lo general, no se reporta su inmunorreacción en la lámina I (8,20-24). Estas diferencias específicas para las especies en la distribución de proteínas como la PV, se han reportado anteriormente en otras áreas del sistema nervioso de los mamíferos (25). Por otra parte, al estudiar el área ventromedial y el asta ventral de la médula espinal, la marcación de CB y PV no muestra diferencias con los reportes anteriores en gato (8) y rata (20).

Cuadro 2. Datos del análisis densitométrico para CB y PV en ratones control y ratones infectados con rabia. Cada dato corresponde a los promedios de cinco cortes. Los valores menores para PV en los infectados, significan menor cantidad de luz transmitida (mayor densidad óptica), es decir, incremento en la concentración de la proteína. Los mayores valores para CB en los infectados significan mayor cantidad de luz transmitida (menor densidad óptica), por lo tanto, pérdida en la concentración de la proteína. La escala de luz transmitida es 0-255 nm.

	Intracerebral		Intramuscular	
Parvoalbúmina	**Control**	**Infectado**	**Control**	**Infectado**
	150,92 (18,9)	123,06 (19,1)	132,53 (28,9)	95,18 (26,5)
	154,41 (17,0)	145,90 (22,5)	102,48 (26,0)	93,77 (26,1)
	190,48 (31,4)	132,50 (36,6)	102,28 (25,5)	88,24 (20,8)
	174,57 (12,5)	131,41 (14,6)	103,40 (22,2)	91,50 (24,2)
	160,25 (19,1)	139,50 (22,5)	123,40 (22;3)	89,05 (24,0)
	*p = 0,0079***	*p = 0,0079***		
Calbindina	**Control**	**Infectado**	**Control**	**Infectado**
	157,51 (29,3)	192,44 (26,1)	161,88 (28,9)	172,76 (24,9)
	140,55 (28,0)	187,23 (32,4)	155,62 (26,0)	167,57 (28,8)
	154,92 (34,2)	171,61 (27,4)	164,20 (25,5)	164,49 (24,1)
	135,94 (33,9)	176,22 (26,2)	167,19 (22,2)	169,99 (24,3)
	155,50 (40,6)	173,43 (28,2)	156,63 (22;3)	168,35 (19,4)
	*p=0,0079***	*p=0,0159***		

** Diferencia significativa

Entre los paréntesis están incluidas las desviaciones estándar.

Efecto de la infección viral sobre la expresión de CB y PV

El diagnóstico de la infección con el virus de la rabia permitió determinar que 96 horas después de la inoculación intracerebral y 144 horas de la inoculación intramuscular, los antígenos virales se encuentran diseminados en la médula espinal cervical. El antisuero permitió demarcar los cuerpos neuronales y las dendritas, de tal manera que reveló la morfología celular completa; esto se explica por la dispersión de los antígenos virales (18). El tiempo de diseminación del virus desde el cerebro hasta la médula espinal fue menor que el reportado en otro estudio en ratones inoculados por vía intracerebral (26).

El virus afectó la expresión de las dos proteínas en la médula espinal por las dos vías de inoculación. El material infectado presentó una disminución de la inmunorreacción para CB, con pérdida generalizada en todas las láminas de Rexed. Esto coincide con nuestros estudios previos en los que se demostró pérdida de CB en la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo (13,14,18). En diferentes afecciones del sistema nervioso central se ha encontrado disminución de la expresión de CB, por ejemplo, reducción del número de células de Purkinje positivas para CB en casos de degeneración espinocerebelar (27), así como disminución de la expresión de esta proteína en el hipocampo de ratas epilépticas (28). Son escasas las referencias relacionadas con pérdida de CB en la médula espinal. En conejos sometidos a lesiones isquémicas medulares transitorias, se presentó pérdida en la expresión de esta proteína en el asta dorsal de la médula espinal (29).

No se puede afirmar que el menor número de neuronas positivas para CB corresponda a una pérdida por muerte neuronal, dado que la apoptosis no es una condición que se evidencie en la médula espinal de ratones inoculados por vía intracerebral (26). En general, la apoptosis no parece ser un fenómeno importante en la fisiopatología de la rabia (30,31). Sin embargo, es posible que el virus genere alteraciones funcionales en las neuronas que expresan esta proteína. La pérdida de CB puede ocasionar efectos graves sobre la función celular y la integración neuronal. La falta de CB en las neuronas puede afectar su homeostasis ante la menor capacidad para regular la entrada de Ca++.

A diferencia de lo ocurrido con la CB, la inmunorreacción de PV se incrementó después de la infección con el virus de la rabia. Esto fue evidente tanto con el aumento de la inmunotinción revelado por el análisis densitométrico como en el conteo celular. El incremento en la inmunorreacción a PV permitió observar mejor las fibras nerviosas en todas las regiones de la médula espinal. Se debe resaltar el aumento significativo de PV en las láminas I y II, en donde la CB disminuyó drásticamente después de la infección.

Previamente se había descrito el incremento densitométrico de la inmunorreacción a PV inducido por la rabia en la corteza cerebral, aunque no se observó aumento del número de células positivas para PV (11,32). Por lo tanto, esta sería la primera vez que se reporta un aumento de células positivas para PV como reacción a una enfermedad neurológica. Esto no significa que efectivamente las neuronas se hayan reproducido; la explicación más probable es que el aumento de inmunorreacción a PV, inducido por la rabia, hizo que neuronas positivas para PV con bajas concentraciones de la proteína, no detectables por la técnica en condiciones normales, se hicieran visibles por un aumento de la concentración citoplásmica de PV.

Otras enfermedades del sistema nervioso, cuando afectan a la PV (no siempre ocurre), lo hacen disminuyendo su expresión. Por ejemplo, la enfermedad de Creutzfelt-Jakob (encefalopatía espongiforme, también llamada de las “vacas locas”) produce pérdida generalizada de PV en casi todo el encéfalo (33,34). Además, la inflamación de los nervios periféricos produjo un deterioro de la inmunotinción de este marcador en el asta dorsal en la médula de ratas (35).

En un estudio de biología molecular llevado a cabo en ratones inoculados con virus fijo de la rabia, se encontró que el virus induce la caída en la expresión de la mayoría de genes estudiados (no estaban incluidos CB y PV), pero un pequeño porcentaje de ellos aumentó su expresión (36). De esta manera se puede concluir que la infección del sistema nervioso con el virus de la rabia puede eventualmente aumentar la expresión de algunas proteínas.

Se sabe que CB y PV son proteínas características de una subpoblación de neuronas que utilizan el ácido gamma amino-butírico (*Gamma-Aminobutyric Acid,* GABA) como neurotransmisor en la corteza cerebral (13,15). Igualmente, se han encontrado células GABA-érgicas positivas para CB y PV en el asta dorsal de la medula espinal (21,37). La glicina es

el segundo neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso y se localiza principalmente en la médula espinal. Su concentración es particularmente importante en las láminas II y III de la médula de ratas. Esto sugiere que la inmunorreacción para PV no solamente se distribuye en las neuronas GABA-érgicas, sino también, en neuronas glicin-érgicas (21). Además, se considera que el GABA y la glicina pueden co-existir en una misma neurona (38). Por lo tanto, así como el virus de la rabia afecta poblaciones de células GABA-érgicas en el encéfalo de ratones (13-15) y, por ende posiblemente el ciclo GABA/glutamato (15,16), podría también afectar el metabolismo del GABA y la glicina en la médula espinal. Por ejemplo, la manifestación de la parálisis en el tren posterior de los ratones infectados con el virus de la rabia por vía intramuscular, es similar a la observada en ratones mutantes desprovistos del transportador de glicina (GLyT2) (39).

El aumento o disminución de la inmunorreacción de un marcador tras una enfermedad se puede atribuir a reorganización neuroquímica. El deterioro en la expresión de una proteína es compensado por la expresión de otras de función similar (40). En el caso de la rabia, el aumento de PV podría ser consecuencia de la pérdida de expresión de CB con el fin la disminuir el calcio residual y evitar su efecto citotóxico (41). Los cambios en la expresión de las proteínas de enlace de calcio, sugieren un papel en el procesamiento nociceptivo espinal, la regulación visceral y de las vías de la columna dorsal sensorial (20,35). En conclusión, la infección con el virus de la rabia en ratones produjo una disminución en la expresión de CB y un aumento en la expresión de PV, en la médula espinal, de manera similar a como se había descrito antes para el encéfalo de ratones. Esto sugiere una respuesta uniforme de estas dos proteínas a la infección por rabia en todo el sistema nervioso central (11,13,14), a diferencia de otras enfermedades en las que se ha reportado reaciones diferentes según el área estudiada. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer induce pérdida importante de CB en neuronas del núcleo basal de Meynert responsables de la síntesis de acetilcolina (42), pero no se ha observado el mismo efecto en neuronas positivas para CB de la corteza cerebral visual (43).

Financiación

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Salud, Subdireccion de Investigacion, por la financiacion de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores consideran que no existe ningún conflicto de intereses que pueda afectar los resultados de este trabajo**.**

Referencias

1. **Wunner WH, Briggs DJ.** Rabies in the 21th century. Plos Negl Trop Dis. 2010;4:591. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000591
2. **Carrada-Bravo T.** Rabia. Visión nueva de un mal milenario. Rev Mex Patol Clin. 2004;51:153-66.
3. **Wilde H, Lumlertdacha B.** Rabies research in resource-poor countries. Adv Virus Res. 2011;79:449-55. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00021-4
4. **Yousaf MZ, Qasim M, Zia S, Khan M, Ashfaq UA, Khan S.** Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. Virol J. 2012;9:50. http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-50
5. **Jackson AC.** Update on rabies. Res Rep Trop Med. 2011;2:31-43.
6. **Jackson AC.** Actualización sobre la patogénesis de la rabia. Rev Pan-Amaz Saude. 2010;1:167-72.
7. **Tsiang H, Lycke E, Ceccacaldi P, Ermine A, Hirardot X.** The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. J Gen Virol. 1989;70:2075-85. http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-70-8-2075
8. **Anelli R, Heckman C.** The calcium binding proteins calbindin, parvalbumin, and calretinin have specific patterns of expression in the gray matter of cat spinal cord. J Neurocytol. 2005;34:369-85. http://dx.doi.org/10.1007/s11068-006-8724-2
9. **Baimbridge K, Celio M, Rogers J.** Calcium-binding protein in the nervous system. Trends Neurosci. 1992;15:303-8. http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(92)90081-I
10. **Ulfig N.** Calcium-binding proteins in the human developing brain. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2002;165:1-92. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59425-0
11. **Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE, Pimienta HJ.** Efecto de la infección por el virus de la rabia sobre la expresión de parvoalbúmina, calbindina y calretinina en la corteza cerebral de ratones. Biomédica. 2004;24:63-78.
12. **DeFelipe J**. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. Prog Brain Res. 2002;136:215-38.
13. **Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE, Pimienta HJ.** Calbindin distribution in cortical and subcortical brain structures of normal and rabies-infected mice. Int J Neurosci. 2005;115:1375-82.http://dx.doi.org/10.1080/ 0020745059095639
14. **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;39:7-13.
15. **Rengifo AC, Torres-Fernández O**. Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia. Biomédica. 2007;27:548-58.

16. **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.

17. **Meslin FX, Kaplan M, Koprowski H.** Laboratory techniques in rabies. 4ª edicion. Finlandia: WHO; 1996. p. 80-7.

18. **Lamprea N, Ortega L, 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.

19. **Schefler W.** Bioestadistica. México: Fondo Educativo; 1981.

20. **Ren K, Ruda M.** A comparative study of the calcium binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin the rat spinal cord. Brain Res Brain Res Rev. 1994;19:163-79.http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8

21. **Wang W, Wu SX, Li YQ.** Co-existence of calcium-binding proteins and γ-aminobutyric acid or glycine in neurons of the rat medullary dorsal horn. Chin Med J. 2004;117:430-3.

22. **Yoshida S, Senba E, Kubota Y, Hagihira S, Yoshiya I, Emson PC, *et al.*** Calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. Neuroscience. 1990;37:839-48. http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(90)90113-I

23. **Endo T, Onaya T.** Parvalbumin is reduced in the peripheral nerves of diabetic rats. J Clin Invest. 1986;78:1161-4. http://dx.doi.org/10.1172/JCI112697

24. **Antal M, Freund TF, Polgar E.** Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin- D28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: A light and electron microscopic study. J Comp Neurol. 1990;295:467-84.

25. **Hof P, Glezer I, Conde F, Flagg R, Rubin M, Nimchinsky E, *et al.*** Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin and calretinin in the neocortex of mammals: Phylogenetic and developmental patterns. J Chem Neuroanat. 1999;16:77-116. http://dx.doi.org/10.1016/S0891-0618(98)00065-9

26. **Kojima D, Park CH, Tsujikama S, Kohara K, Hatai H, Oyamada T, *et al.*** Lesions of the central nervous system induced by intracerebral inoculation of BALB/c mice with rabies virus (CVS-11). J Vet Med Sci. 2010;72:1011-6. http://dx.doi.org/10.1292/jvms.09-0550

27. **Ishikawa K, Mizusawa H, Fujita T, Ohkoshi N, Doi M, Komatsuzaki Y, *et al.*** Calbindin-D 28k immunoreactivity in the cerebellum of spinocerebellar degeneration. J Neurol Sci. 1995;129:179-85. http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X(94)00279-W

28. **Carter DS, Harrison AJ, Falenski KW, Blair RE, DeLorenzo RJ.** Long-term decrease in calbindin-D28K expression in the hippocampus of epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. Epilepsy Res. 2008;79:213-23. http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.02.006

29. **Lee JC, Hwang IK, Cho JH, Moon SM, Kang TC, Kimn WK, *et al.*** Expression and changes of calbindin D-28k immunoreactivity in the ventral horn after transient spinal cord ischemia in rabbits. Neurosci Lett. 2004;369:145-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2004.07.082

30. **Suja M, Mahadevan A, Madhusudana SN, Shankar SK.** Role of apoptosis in rabies viral encephalitis: A comparative study in mice, canine, and human brain with a review of literature. Patholog Res Int. 2011;2011:1-13. http://dx.doi.org/10.4061/2011/374286

31. **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. http://dx.doi.org/10.1080/13550280802216502

32. **Torres-Fernández O**, **Yepes GE, Gómez JE, Pimienta HJ.** La infección por el virus de la rabia induce aumento de la expresión de parvoalbúmina en la corteza cerebral de ratones. Rev Asoc Col Cienc Biol. 2004;16:140.

33. **Ferrer I, Casas R, Rivera R.** Parvalbumin-immunoreactive cortical neurons in Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol. 1993;34:864-6.

34. **Guentchev M, Wanschitz J, Voigtländer T, Flicker H, H Budka.** Selective neuronal vulnerability in human prion diseases. Fatal familial insomnia differs from other types of prion diseases. Am J Pathol. 1999;155:1453-7. http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65459-4

35. **Zacharova G, Sojka D, Palecek J.** Changes of parvalbumin expression in the spinal cord after peripheral inflammation. Physiol Res. 2009;58:435-42.

36. **Prosniak M, Hooper DC, Dietzschold B, Koprowski H.** Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:2758-63.

37. **Antal M, Polgar E, Chalmers J, Minson JB, Llewellyn-Smith I, Heizmann CW, *et al.*** Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. J Comp Neurol. 1991;314:114-24.

38. **Amakhin DV, Veselkin NP.** Effect of GABA and glycine neuromediator interaction in the central nervous system. Tisitologiia. 2012;54:469-77.

39. **Gomeza J, Ohno K, Hülsmann S, Armsen W, Eulenburg V, Richter DW, *et al.*** Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. Neuron. 2003;40:797-806. http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00673-1

40. **Pascual R.** Deterioro cerebeloso inducido por aislamiento social temprano: estudio morfológico e inmunohistoquímico. Rev Chil Neuro-Psiquiat. 2001;39:57-68. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272001000100019

41. **Alturi PP, Regehr WG.** Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. J Neurosci. 1996;16:5661-71.

42. **Geula C, Nagykery N, Wu CK, Bu J.** Loss of calbindin from aging human cholinergic basal forebrain: Relation to plaques and tangles. J Neuropathol Exp Neurol. 2003;62:605-16.

43. **Leuba G, Kraftsik R, Saini K.** Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. Exp Neurol.1998;152:278-91.http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1998.6838