

R



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

**ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL E INMUNOCITOQUIMICO
DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN RATONES LACTANTES
INOCULADOS CON VIRUS RABICO**

T R A B A J O

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLOGICAS
P R E S E N T A :

PALMIRA SILVA SERNA

Director del Trabajo: DR. GERARDO VAZQUEZ NIN

Asesor: M. V. Z. AURORA VELAZQUEZ ECHEGARAY



México, D. F.

1994

Silva Serna



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se elaboró en el laboratorio de Microscopía
Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo
la dirección del Dr. Gerardo Vázquez Nin.

A MIS PADRES

José Silva C y María Luisa Serna M.
con cariño y respeto por seguir apoyándome
en mi trayectoria como hija y profesionalista.

A MIS HERMANOS

Homéro, Netzahualcoyotl, Horacio, Othali
Héctor y Diana por alentarme en en mi superación

A MIS SOBRINOS

Homéro, Diana, Ulises, Fanny y Estephanía por
su ternura.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Vázquez Nin por su valiosa colaboración en la dirección, desarrollo y finalización de este trabajo.

A la M.V.Z. Aurora Velázquez Echegaray por su asesoría, trascendencia y paciencia en la realización de este manuscrito, así como el apoyo que me ha brindado en mi trayectoria como profesionalista.

A la Dra. Olga M. Echeverría Martínez por la enseñanza, consejos y condescendencia en la especialización en Microscopía Electrónica.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, al Espec. en M.E. Marco A. González Jiménez y a la M en C. Lordes Segura Valdez por aceptar formar parte del jurado y por las sugerencias brindadas en la realización de este trabajo.

Al Dr. Leopoldo Paasch Martínez por haberme otorgado el permiso para asistir a la Especialización en Microscopía Electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas.

A mis amigos del Lab. de Microscopía Electrónica de la Facultad de ciencias.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica.

I N D I C E

Resumen.....	2
Introducción.....	4
Objetivo.....	17
Material y Métodos.....	18
Resultados.....	25
Discusión.....	33
Conclusiones.....	38
Literatura Citada.....	39

T I T U L O

ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL E INMUNOCITOQUIMICO
DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN RATONES LACTANTES
INOCULADOS CON VIRUS RABICO

R E S U M E N

En el presente trabajo se analizó al microscopio electrónico de transmisión la ultraestructura e inmunocitoquímica del sistema nervioso central de 18 ratones suizos albinos, de los cuales 4 se utilizaron como controles y los demás se inocularon al día de nacidos con virus rábico aislado de perro. Se manifestaron signos nerviosos entre el 80. y 90. días post-inoculación muriendo 5 de ellos a los tres días, desechándolos. El décimo día se procesaron los tejidos de la corteza cerebral y cerebelosa de los animales que manifestaron signos nerviosos de rabia y de controles con la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión y para la técnica de inmunolocalización. En el análisis morfológico de diferentes zonas del cerebro se observó la presencia de corpúsculos de Negri, algunos de los cuales contienen partículas virales. Además se visualizó la presencia de virus completos densamente teñidos y de membranas fosfolipídicas sin el contenido denso de la nucleocápside y cápsides en el citoplasma de neuronas

aparentemente normales.

Para la técnica de inmunolocalización ultraestructural indirecta se utilizaron inmunoglobulinas contra rabia producidas en humano (OBEM 09) y en equino como anticuerpos primarios. Inmunoglobulinas de conejo contra IgG de humano e IgG de equino como anticuerpos secundarios y una inmunoglobulina de cabra contra IgG de conejo unida a partículas de oro coloidal (GARG 15 de 15 nm) como anticuerpo terciario. Se observó la presencia de gránulos de oro asociados a estructuras fibrilares unidas a cisternas del retículo endoplásmico y a fibrillas de la matriz de los corpúsculos de Negri. Lo anterior sugiere la síntesis inicial de proteínas virales que aún no se han agrupado y estructurado, así como de membranas fosfolipídicas con proteínas virales que son reconocidas por los anticuerpos que posiblemente pertenecen a etapas de formación o restos fallidos e incompletos de las partículas virales conocidos como virus defectuosos.

I N T R O D U C C I O N

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda y mortal que afecta a todos los animales homeotérmicos, incluido el género humano. El agente etiológico es un virus, que afecta principalmente al Sistema Nervioso Central (SNC) y se transmite frecuentemente por la mordedura de un animal infectado (Hutyra et al.,1959; Jubb y Kennedy,1974; Hagan y Bruner, 1975; Aguilar et al.,1986).

Uno de los aspectos históricos más antiguos sobre la infección rábica, es el código Babilonio de Eshnunna escrito 2,300 años a.c. que describió la transmisión de la rabia por un perro infectando a las personas a través de la mordedura (Tierkel, 1982) . En antiguos escritos chinos se demostró la presencia de la rabia canina siglos a.c. (Baer, 1975). Gardano, escritor romano, comunicó la infecciosidad de la saliva de perros

rabiosos. Los romanos describen el material infeccioso como un veneno usando la palabra latina "virus" (Steele, 1982).

La partícula viral pertenece a la familia Rhabdoviridae, género Lissavirus. Tiene forma de bala, un cilindro con un extremo redondeado y otro plano que mide de 130 a 180 nm de largo x 7 nm de ancho (Aviles, 1981; Fenner y White, 1987; Fenner y White, 1988).

Está formado por una envoltura y un complejo nucleoproteico interno llamado cápside (Wunner y Larson, 1988). La envoltura está compuesta por una doble capa fosfolipídica obtenida de la membrana de la célula infectada y proteínas virales insertadas hacia afuera y hacia adentro de ella. Las externas se llaman peplómeros y las internas matriz.

Los peplómeros están constituidos por una glicoproteína de 65 kDa que sobresale 10 nm de la envoltura fosfolipídica en forma de espículas. Esta es la única glicoproteína del virus y presenta los principales epítomos de superficie. Una secuencia de aminoácidos (175-203) de esta proteína constituyen la llamada asa 2 que reacciona con el sitio de unión a la acetilcolina del receptor nicotínico de la post-sinapsis de las uniones

colinérgicas (Donnelly-Roberts y Lentz, 1991). Esta propiedad es común con otras neurotoxinas y produce gran parte de la sintomatología nerviosa de la enfermedad. La matriz es una proteína de 26 kDa, que sobresale hacia adentro de la capa fosfolipídica y se haya en contacto con la nucleocápside. Esta tiene una estructura helicoidal apretada de 35 vueltas que ocupan todo el virión. En el microscopio electrónico aparece como estriaciones transversales al eje del virus. Dicha hélice está formada por RNA y tres proteínas. El RNA es de una sola hebra de 4.2-4.6 μm de largo, alrededor de 4.6 kDa de peso molecular y contiene la secuencia de bases complementaria a la del mensajero. La proteína más abundante tiene 55 kDa y está presente en unas 1800 moléculas unidas al RNA. Las otras dos proteínas menos abundantes son una transcriptasa de alrededor de 190 kDa y una proteína fosforilada no estructural de 38 kDa.

Las partículas del virus rábico contienen dos antígenos principales netamente diferenciados; la glicoproteína procedente de la envoltura y la nucleoproteína interna. La glicoproteína parece ser el único antígeno capaz de provocar la formación de anticuerpos neutralizantes del virus y de proteger a los animales contra la exposición ulterior al virus de la rabia (Aguilar et al., 1986; Salido, 1974). Sin embargo, la

mezcla de los dos anticuerpos protege más contra la enfermedad que cada uno por separado.

Se han identificado 4 serotipos:

- 1) Virus estándar de confrontación cepa CVS-24. En este serotipo se encuentran la mayoría de las cepas de calle que han sido aisladas de perros, gatos y animales silvestres como zorras, mofetas y zorrillos además de los virus aislados de vampiros de las Américas (King y Crick, 1988; Mohanty y Dutta, 1983).
- 2) El del murciélago de Lagos. Relacionado con los murciélagos insectívoros, frugívoros y no hematófagos (King y Crick, 1988; Mohanty y Dutta, 1983).
- 3) En este grupo esta el virus Mokola. Aislado de musarañas y hombres del medio selvático en Nigeria y también en murciélagos Nyctalus noctula de Yugoslavia. (King y Crick 1988; Mohanty y Dutta, 1983).
- 4) Duvenhage. Aislado del vampiro serotino Eptesicus serotinus en 1954 en Yugoslavia y España en 1987 (King y Crick 1988; Mohanty y Dutta, 1983).

Los huéspedes susceptibles a esta enfermedad pertenecen a todas las especies de sangre caliente mostrando sensibilidad variada ante la infección, pudiéndose diferenciar como los más sensibles los carnívoros de la fauna silvestre entre los cuales están: la zorra, el lobo y el coyote. De los domésticos los gatos y bovinos. Son medianamente sensibles perros, equinos y primates; y de los menos sensibles, el hombre. También la padecen los ovinos, caprinos, cerdos, gallinas, palomas y de la fauna silvestre los chacales y las hienas, las martas, los monos los ciervos, antílopes, conejos y cobayos (Voigh y Kleimer, 1975; Aguilar et al., 1986).

Los reservorios más importantes que mantienen el virus rábico en la naturaleza son los carnívoros y los quirópteros hematófagos corrientemente llamados vampiros, entre los que se encuentran Desmodus rotundus, Diaemus youngii y Diphilla ecaudata, siendo la Desmodus la mas común y abundante en México causando grandes pérdidas en la ganadería nacional (Hernández 1972; Correa, 1981; Baer, 1982). Los hervíboros y otros animales como los roedores y lagomorfos no desempeñan ningún papel epidemiológico.

El vehículo de transmisión del virus rábico es la saliva de los

animales infectados y se transmite por una solución de continuidad en la piel y/o mucosas (Hutyra et al., 1959; Aviles, 1981; Correa, 1981; Mohanty y Dutta 1983).

El virus se replica en el sitio de inoculación propagándose a través de las terminaciones nerviosas periféricas y viajando por el axonema en forma centripeta hasta alcanzar sistema nervioso central, siendo éste sin duda la meta del virus rábico provocando cambios neuronales. La replicación se lleva a cabo principalmente en las neuronas. La diseminación de la infección sucede por el mecanismo de célula a célula (transneuronal). La morfogénesis del virus ocurre en el citoplasma neuronal, el núcleo no se han identificado antígenos ni virus (Aviles, 1981; Charlton, 1988; Shuneman y col. 1990).

Al principio de la infección neuronal, pequeñas cantidades de viriones se encuentran adyacentes a los gránulos de Nissl, indicando que la replicación viral se inicia en esa zona. Este agente infecta otros órganos, como por ejemplo las glándulas salivales, por movimiento centrífugo a lo largo de la vía axoplásmica, siendo la causa de la acumulación del virus en las secreciones bucales. Además de estar presente en piel, folículos pilosos, en ojo, retina, coroides, cuerpo vítreo, cristalino,

epitelio de la córnea y células ganglionares de la retina de los perros infectados (Charlton, 1988).

El período de incubación es el tiempo transcurrido entre la infección y la primera manifestación de signos clínicos y durante el mismo el virus se disemina a diversos tejidos y órganos (Mohanty y Dutta, 1983).

La siguiente tabla muestra el período de incubación en algunas especies que se señalan a continuación:

Infeción	Aparición de la enfermedad
Hombre	1 a 3 meses
Perro	3 - 8 semanas
Gato	2 - 4 "
Bovino	2 - 4 "
Zorro	25-30 días

(Voigh y Kleimer, 1975)

La rabia en los perros comprende tres tipos de manifestaciones: la fase prodrómica que dura dos o tres días, pero hay ocasiones

en que es inadvertida, pues los signos son fugaces o poco marcados. La fase furiosa o exitativa, se caracteriza por inquietud, nerviosismo, irritabilidad del animal, excitabilidad, fotofobia e hiperestesia así como depravación del apetito. Finalmente la fase paralítica asciende de la musculatura de las extremidades y el tronco provocando primero ataxia que aumenta hasta llegar a la parálisis total. Estas manifestaciones inevitablemente llevan a la muerte (Hutyra et al., 1959; López y Hernández, 1975; Tierkel 1982).

Experimentalmente con virus fijo, se ha observado que el virus persiste en el sitio de inoculación de 4 a 96 h después viaja por troncos nerviosos hasta llegar a los ganglios espinales que proporcionan inervación al sitio inoculado en donde los virus se replican, después invaden sistema nervioso central (virus neurotrópico) como órgano blanco. (Correa, 1981)

En el cuadro anatomopatológico resaltan los corpúsculos de Negri (cuerpos de Negri), que siempre son intracitoplasmáticos y se encuentran con mayor frecuencia en el hipocampo, cerebro, cerebelo y médula oblonga dependiendo de la especie afectada. Los corpúsculos de Negri son estructuras redondas u ovaladas que pueden medir de 2 a 8 micras de diámetro, tienen gran capacidad

plástica y su forma se adapta al medio que las rodea. Se cree que estos corpúsculos son conglomerados de partículas virales de rabia. Tienen una membrana limitante bien clara y pueden estar rodeados por un halo claro estrecho. Estos deben diferenciarse de otros similares producidos por ciertos virus y que se denominan cuerpos de Lysa. La diferencia radica en que éstos son mas abundantes, mas refringentes y carecen de estructura interna (Tierkel 1982; Atanasiu, 1959).

En las diversas especies animales los corpúsculos de Negri presentan diferentes tamaños y formas, los encontrados en felinos tienen forma esférica y son de mucho menor tamaño que los observados en la especie canina, que en este caso son ovales o alargados (Salido, 1974).

Sólo en los corpúsculos de Negri de gran tamaño es posible observar granulaciones basófilas envueltas en la matriz y otras estructuras reticulares que parecen formar el armazón de la matriz acidófila distribuídas en el cuerpo neuronal y las dendritas (Tierkel, 1959; González y Steephano 1984; Correa, 1981).

A nivel de microscopía electrónica se observa una infiltración y

ruptura focal de la mielina, algunas neuronas contienen una sustancia granular procedente de la nucleocápside viral, también se observa un incremento de proteína viral principalmente en el retículo endoplásmico y a veces en la membrana plasmática (Makonnen, 1988). Hay infiltración linfocitaria perivascular e invasión de las células gliales proliferantes lo que se conoce como nódulos de Babes (Schuneman y col. 1990).

Para el diagnóstico de la rabia se utilizan diferentes estudios de laboratorio tales como:

Histopatológico.- En donde se hace un muestreo de tejidos como corteza cerebral, hipocampo y cerebelo que se fijan en formol al 10% a temperatura ambiente y se efectúan inclusiones en parafina, se cortan, se coloca en una laminilla y se tiñe con hematoxilina-eosina, fucsina o Mann y se hace la búsqueda de corpúsculos de Negri en el microscopio óptico. Prueba efectiva de 70% (Lepine, 1966)

Tinción Seller.- Técnica sencilla y segura en donde se utilizan improntas que se tiñen con el colorante de Seller a base de

fucsina básica y azul de metileno, se lavan y se secan a temperatura ambiente, lista para la observación en la búsqueda de corpúsculos de Negri in situ (Tierkel, 1959).

Anticuerpos Fluorescentes.- Técnica desarrollada por Coons y Kaplan en 1950 y adaptada para el diagnóstico de rabia por Guldwasser y Kissling en 1958 (Larhgi, 1975). Se basa en el uso de gamaglobulina antirrábica conjugada con isotiocianato de fluoresceína para detectar antígeno presente en el tejido, el anticuerpo marcado teñido con el colorante fluorescente reacciona con el antígeno específico y la reacción se observa en el microscopio de fluorescencia. Es una de las pruebas de detección mas exactas (Larghi, 1975).

Prueba Biológica.- Para ésta prueba se utiliza el ratón blanco suizo, en condiciones saludables y previamente adaptado al ambiente del laboratorio. Los tejidos preferentes para inocular a los ratones son cerebro, cerebelo y la parte de la corteza cerebral. (Koprowsky, 1966; Salido, 1974; Tierkel, 1959)

Observación de ratones inoculados.- Después de la inoculación es muy raro que se observen signos clínicos de la rabia antes del 50. día post-inoculación; sin embargo, deben observarse desde el

primer día hasta cumplir 21 días como mínimo. Los signos presentes son pelo erizado, temblores, inhibición de la coordinación de los miembros posteriores, parálisis y postración antes de morir. Las muertes que ocurran a las 24-48 h post-inoculación son atribuidas a traumatismos, contaminación bacteriana y otros virus. A partir del 5o. día post-inoculación se sacrifican y se buscan corpúsculos de Negri, aplicando la técnica de inmunofluorescencia (Koprowsky, 1966; Correa, 1981).

INMUNOLOCALIZACION

Es una técnica que utiliza la reacción específica antígeno-anticuerpo para localizar sustancias dentro de un tejido. Se debe contar con un anticuerpo específico (primario) que reconoce al antígeno buscado. Pueden ser:

Directa: un anticuerpo específico está marcado de tal forma que al ser incubado con el tejido, se evidencia el antígeno en estudio.

Indirecta: el tejido se incuba con el anticuerpo primario que

reconocerá el antígeno buscado, después se incuba con otro anticuerpo (secundario) que reconocerá al primario y un anticuerpo marcado con oro (terciario) que reconocerá al secundario evidenciándose la reacción (Ag-Ac) al microscopio electrónico (Romano y Romano, 1984).

O B J E T I V O

El objetivo del presente trabajo es analizar morfológicamente las lesiones provocadas por el virus rábico y localizar los sitios de unión antígeno-anticuerpo, es decir, conocer la distribución de proteínas virales intracelularmente, por medio de la inmunomicroscopía electrónica.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

En este estudio se procesaron para microscopía electrónica 14 ratones suizos albinos lactantes, de los cuales 4 se utilizaron como normales o testigos (2 para la técnica de rutina y 2 para la técnica de inmunolocalización). En la técnica de rutina se procedió de la siguiente manera: se anestesiaron con éter y se sacrificaron dos ratones, tomándose pequeños fragmentos (1mm^3) de corteza cerebral y cerebelosa, se fijaron por inmersión con:

- a) Glutaraldehído al 2.5% amortiguado en fosfatos (0.16 M y pH de 7.2)
- b) Glutaraldehído al 2.5% + Goma Aràbiga
- c) Glutaraldehído al 2.5% + Goma Arábica + Agua Oxigenada

d) Glutaraldehído al 2.5% + Agua Oxigenada.

Se mantuvieron durante 15 min a 4^oC y 45 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con buffer de fosfatos.

Se post-fijaron en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1 % durante una hora a temperatura ambiente y se hicieron 3 lavados de 15 min. cada uno con buffer de fosfatos.

La deshidratación se realizó con alcoholes graduales del 70%, 80% ,90% y 96% durante 15 min cada uno y 100% con tres cambios de 10 minutos c/u. Después se pasaron al óxido de propileno con 3 cambios de 15 min c/u.

La infiltración se hizo con una mezcla 1:1 de óxido de propileno y una resina epóxica (Glycidether 100, Merck) durante 24 h a temperatura ambiente.

La inclusión se realizó en moldes, con la mencionada resina epóxica. Se polimerizó a 60^oC durante 24 h.

Se hicieron cortes semifinos de aproximadamente 1 μm de grosor en un ultramicrotomo MT-2 (Sorvall). Se observaron al microscopio óptico, se seleccionaron áreas, después se procedió a hacer cortes ultrafinos de 60-90 nm, que se levantaron en rejillas de cobre cubiertas con una membrana de formvar en su cara superior que sirve como soporte a los cortes. .

Los cortes se contrastaron colocando las rejillas en una gota de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al .3% durante 20 y 10 minutos respectivamente, en cada cambio se enjuagó por goteo con agua bidestilada y secas las rejillas se observaron en un Microscopio Electrónico EM 10 (Carl Zeiss).

PREPARACION DE INOCULO

Se maceró 1 g de cerebro canino positivo a rabia, en un mortero de Ten Broeck, se virió en un tubo de ensaye con 9 ml de solución salina, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y se le agregó 0.2 mg de estreptomycin y 500 UI de penicilina por ml. Estos inóculos se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

REPLICACION DEL VIRUS

Se inoculó 0.03 ml de suspensión intracerebralmente a una camada de 14 ratones lactantes de un día de edad, con agujas del no. 27. Hacia el tercer día murieron 5 de ellos desechándose, al décimo día se procesaron utilizandose 7 ratones en la técnica convencional:

Se anestesiaron con éter y se sacrificaron. El procesamiento fué el descrito anteriormente con la variación de que sólo se utilizó como fijador el glutaraldehído al 2.5% amortiguado con fosfatos (0.16 M y pH 7.2) durante 1 h a temperatura ambiente.

En la técnica de inmunolocalización se utilizò tejido de dos ratones normales como controles y dos que presentaron los signos nerviosos y fueron fijados de la siguiente manera:

- a) Glutaraldehído al 2.5% amortiguado con fosfatos (0.16 M pH de 7.2)

b) Glutaraldehído al 2.5% + paraformaldehído al 4%

c) Paraformaldehído al 4%

De éstos la mitad de los tejidos se procesaron como en la técnica convencional y la otra mitad se hicieron los siguientes cambios:

La deshidratación se realizó con alcoholes graduales del 50% al 90% durante 1 hr. cada uno y 100% de 3 cambios de 1 h c/u a 4°C.

En la infiltración se utilizó LR White (LRW) + etanol 100% 1 : 2 respectivamente a 4°C durante 3 h. Se cambió a LRW (2) + etanol 100% (1) durante 3 h a 4°C y LRW al 100% a 4°C durante 24 h posteriormente se hicieron de 2 a 3 cambios de LRW al 100% durante 1 h cada uno.

Se incluyó en cápsulas de gelatina y la polimerización se llevó a cabo de 50-60°C durante 20 h.

Se hicieron cortes ultrafinos, se montaron en rejillas y se

procedió con la técnica de inmunolocalización.

INMUNOLOCALIZACION

Una vez obtenidas las rejillas se flotaron en una gota de amortiguador de fosfatos con cloruro de sodio (PBS)-ovoalbúmina-tween suspendida en una superficie plana cubierta con papel parafilm en una cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente, se incubó con inmunoglobulina contra rabia producida en humano (OBEM 09) y equino como primer anticuerpo en las diluciones 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 y 1:80 durante 17 h a 4°C.

Se lavaron las rejillas con PBS-tween por goteo, lavados con PBS solo y flotación en vidrio de reloj con PBS durante 15 minutos. Se incubó con proteína A-Oro en dilución 1:10 en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente, enjuagues con PBS por goteo, lavado por goteo con agua deionizada y flotación sobre una gota de agua deionizada durante 15 min. Se secaron con papel filtro y se contrastaron por unos segundos sobre una gota de acetato de uranilo y citrato de plomo realizándose un lavado con

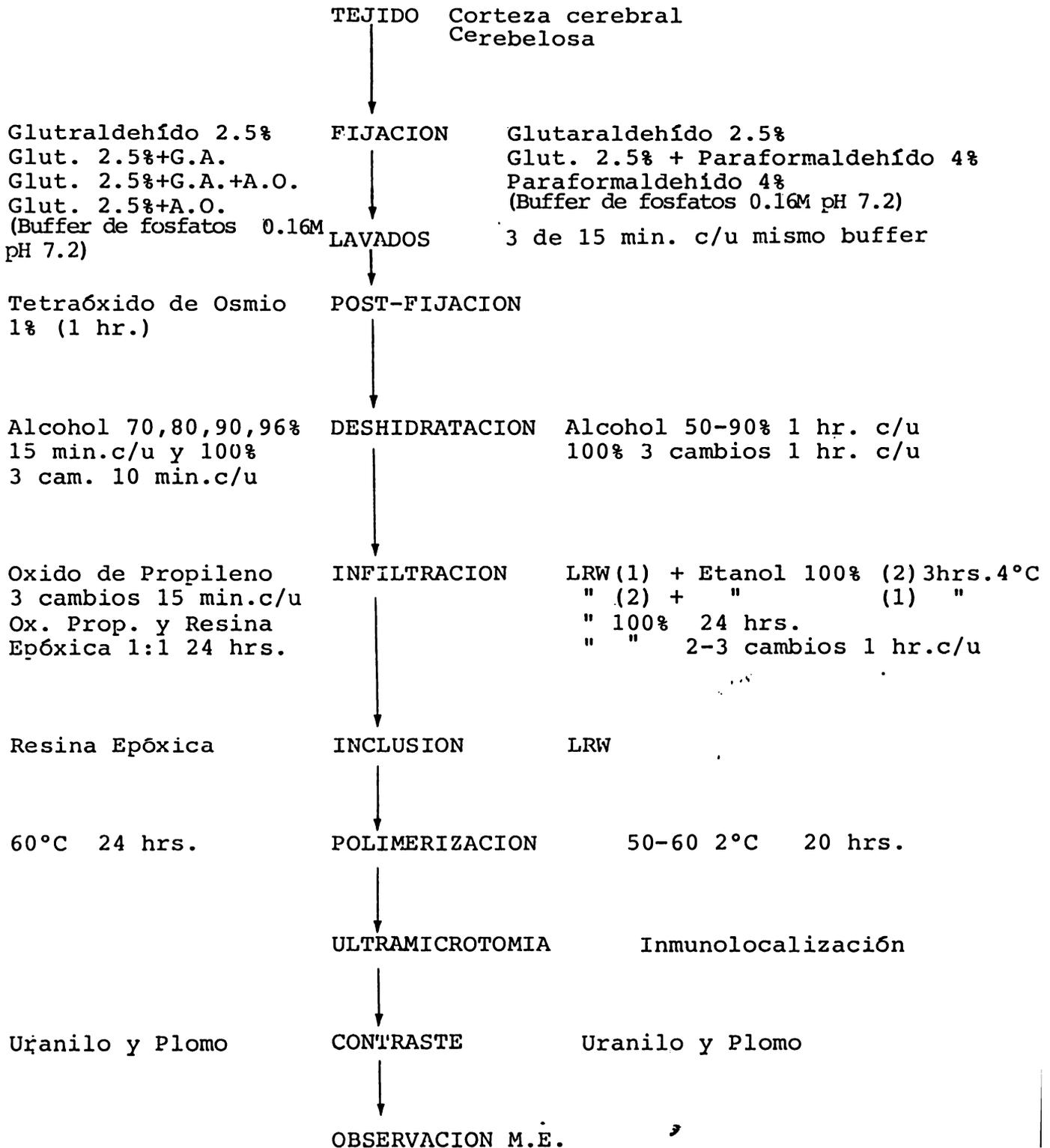
agua bidestilada entre cada uno de éstos, una vez secas se observaron al microscopio electrónico.

Posteriormente se preparó una dilución 1:100 del primer anticuerpo de humano, se filtró con membrana y se centrifugó durante 30 minutos a 2,500 r.p.m. repitiéndose la técnica antes mencionada.

Se modificó la técnica flotando las rejillas en una gota de leche (0.5% PBS-ovoalbúmina de suero bovino (BSA)-tween) a temperatura ambiente con diluciones 1:1000 y 1:5000 del primer anticuerpo, repitiéndose la técnica ya descrita.

También se emplearon diluciones 1:10,000 y 1:20,000 del primer anticuerpo de humano y de equino, utilizando rejillas sin membrana formvar además se usó como 2o. anticuerpo inmunoglobulina de conejo contra IgG de humano e IgG de equino en dilución 1:50 cada uno durante 1 hora y como 3er. anticuerpo se utilizó un monoclonal de cabra contra gamaglobulina de conejo unido a partículas de oro de 15 nm (GAR15), en dilución 1:30 durante media hora.

D I A G R A M A D E F L U J O



TECNICA DE INMUNOLOCALIZACION

- 1.- Flotación en gota de leche a temperatura ambiente durante 15 min. en las diluciones 1:10,000 y 1:20,000
- 2.- Incubación durante 1 h a temperatura ambiente del 1er. anticuerpo.
- 3.- Lavados con PBS-Tween por goteo
- 4.- Lavados con PBS por goteo
- 5.- Flotación con PBS durante 15 min.
- 6.- Flotación con 2° anticuerpo en dilución 1:50 c/u 1 h.
- 7.- Lavado con PBS por goteo
- 8.- Flotación con PBS durante 15 min.
- 9.- Flotación en el 3er. anticuerpo GARG 15 en 1:30 a temperatura ambiente durante 1/2 h.
- 10.- Lavado con PBS por goteo
- 11.- Lavado con Agua bidestilada por goteo
- 12.- Flotación en agua bidestilada durante 15 min.

R E S U L T A D O S

Hacia el tercer día post-inoculación murieron 5 ratones que fueron desechados, el octavo y noveno día el resto de los animales mostraron encorvamiento, temblor y pérdida de la coordinación de las patas traseras. Se empleó el sistema nervioso de éstos ratones que dieron lugar a estos resultados.

En el análisis morfológico de las neuronas de la corteza cerebral y cerebelosa mostró zonas del citoplasma bien localizadas con una estructura fibrilar que desplaza a otros organoides (Figs. 1, 2 ,3). Estas regiones corresponden a los corpúsculos de Negri. La zona de fibrillas está interrumpida por ribosomas aislados o agrupados en polisomas (Figs. 2, 3). En algunos cortes de corpúsculos de Negri no se observan partículas virales o son muy escasas (Figs 1,2), mientras que en otros son abundantes (Fig.3). Es interesante señalar que la mayoría de los virus visibles en la figura 3 están asociados a polisomas y rodeados por la región fibrilar del corpúsculo de Negri. En esta región existen cuatro formaciones tubulares de membrana que se

asemejan a las cápsides virales en su forma, aunque de mayor tamaño y sin la parte central electron densa (flechas). Hacia el interior de las membranas se ve un espacio claro en el que están presentes algunos filamentos (f) que parten de las membranas y a veces se unen a pequeños gránulos (g). La superficie externa de algunos de estos túbulos membranales está en contacto con filamentos que parten radialmente hacia afuera. (Recuadro, cabezas de flecha).

En el citoplasma de algunas neuronas, aparentemente sin alteraciones, se pueden observar algunos virus en corte transversal (flechas) y virus completos con membrana fosfolipídica y cápside densamente teñido (Fig. 4, y 5A) respectivamente, además se encontraron pequeñísimas zonas fibrilares (Fig. 5 A y B) que presentan túbulos membranosos (tm) como los descritos en la figura 3.

La figura 6 muestra gránulos de oro asociados a estructuras fibrilares unidas a cisternas del retículo endoplásmico (RE), a fibrillas de la matriz de un corpúsculo de Negri situadas generalmente en contacto con densificaciones de dicha matriz (flechas) y también sobre túbulos membranosos (cabeza de flecha).

En la figura 7 se puede observar un corpúsculo de Negri (CN) con marca. Los gránulos de oro están presentes también en las fibrillas situadas entre los ribosomas cercanos a dicho corpúsculo (flechas) y se observó la aparente presencia de la nucleocápside desenrollada (cabeza de flecha).

Las figuras 8 y 9 muestran abundante marca asociada a los filamentos externos de los túbulos membranosos (t), a las fibrillas del corpúsculo de Negri (f) y a los ribosomas cercanos del corpúsculo (r).

Las corteza cerebral y cerebelosa de ratones normales o testigos no mostraron ni corpúsculos de Negri, ni marcado a los sueros inmunes utilizados.

Figura no. 1.- Micrografía electrónica de parte del citoplasma (c) de una neurona que muestra un corpúsculo de Negri (CN).
Uraniolo-Plomo X 65,000

Figura no.2.- Micrografía electrónica que muestra un corpúsculo de Negri (CN) interrumpido por ribosomas (r) agrupados en polisomas. Uraniolo-Plomo X 75,000

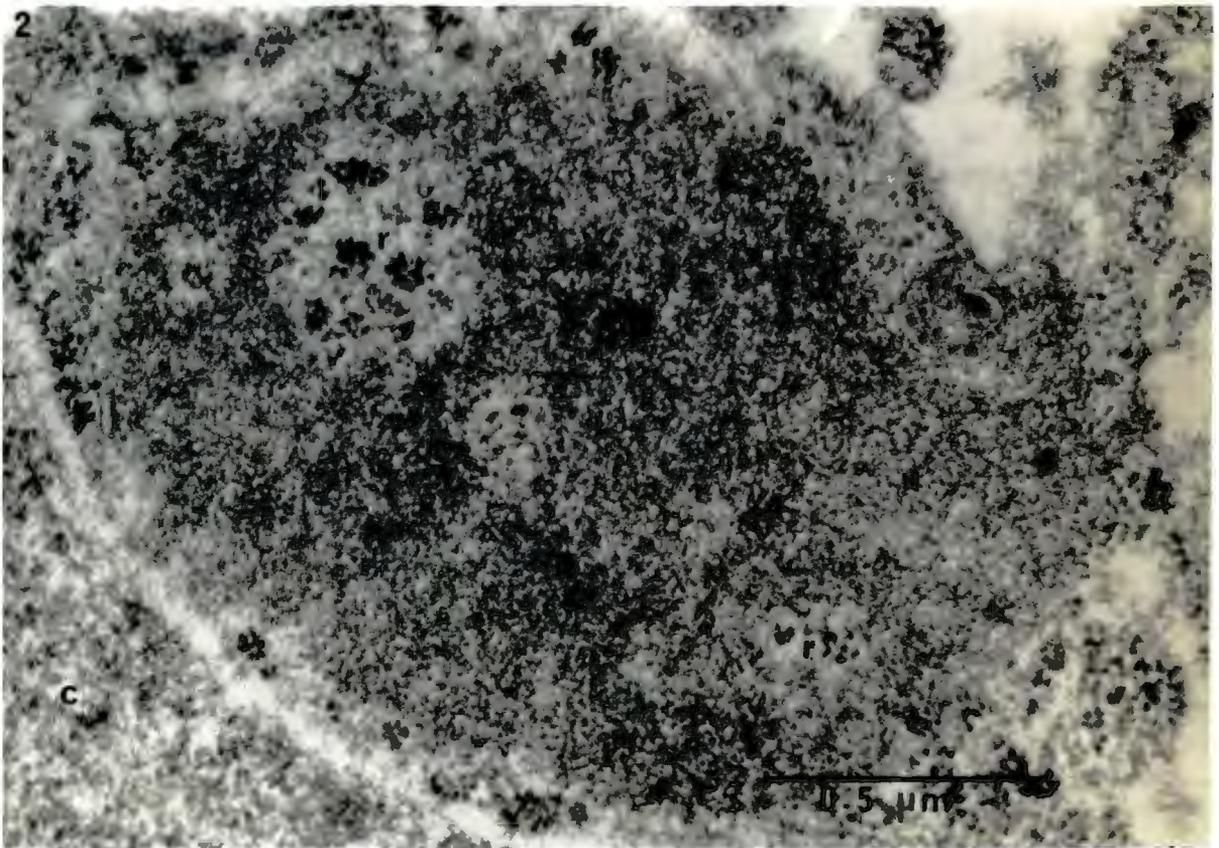
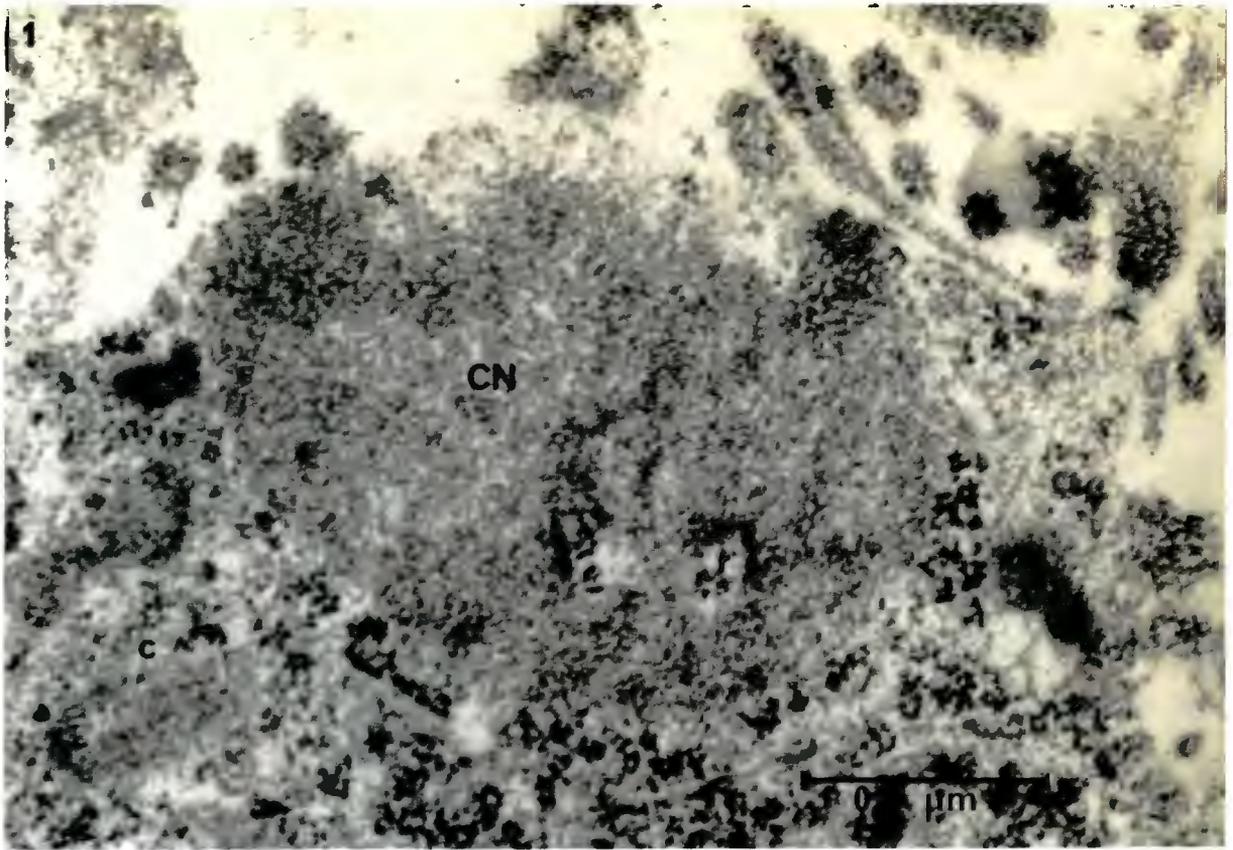


Figura no. 3.- Micrografía electrónica que muestra un corpúsculo de Negri (CN) conteniendo partículas virales (PV) asociados a polisomas. En esta región existen formaciones tubulares de membrana que asemejan a partículas virales en su forma sin la parte central electrodensa (cabeza de flechas) hacia el interior de la membrana, se ve un espacio claro en el que estan presentes algunos filamentos (f) que parten de las membranas y a veces se unen a pequeños gránulos (g). La superficie externa de algunos de estos túbulos membranales está en contacto con filamentos que parten radicalmente hacia afuera, (recuadro, cabezas de flecha).

Uraniolo-Plomo X 85,000

Figura no. 4.- Micrografía electrónica del citoplasma de una neurona que muestra algunas estructuras que por su aspecto se sugiere que son partículas virales (PV) en corte transversal.

Uraniolo-Plomo X 87,600

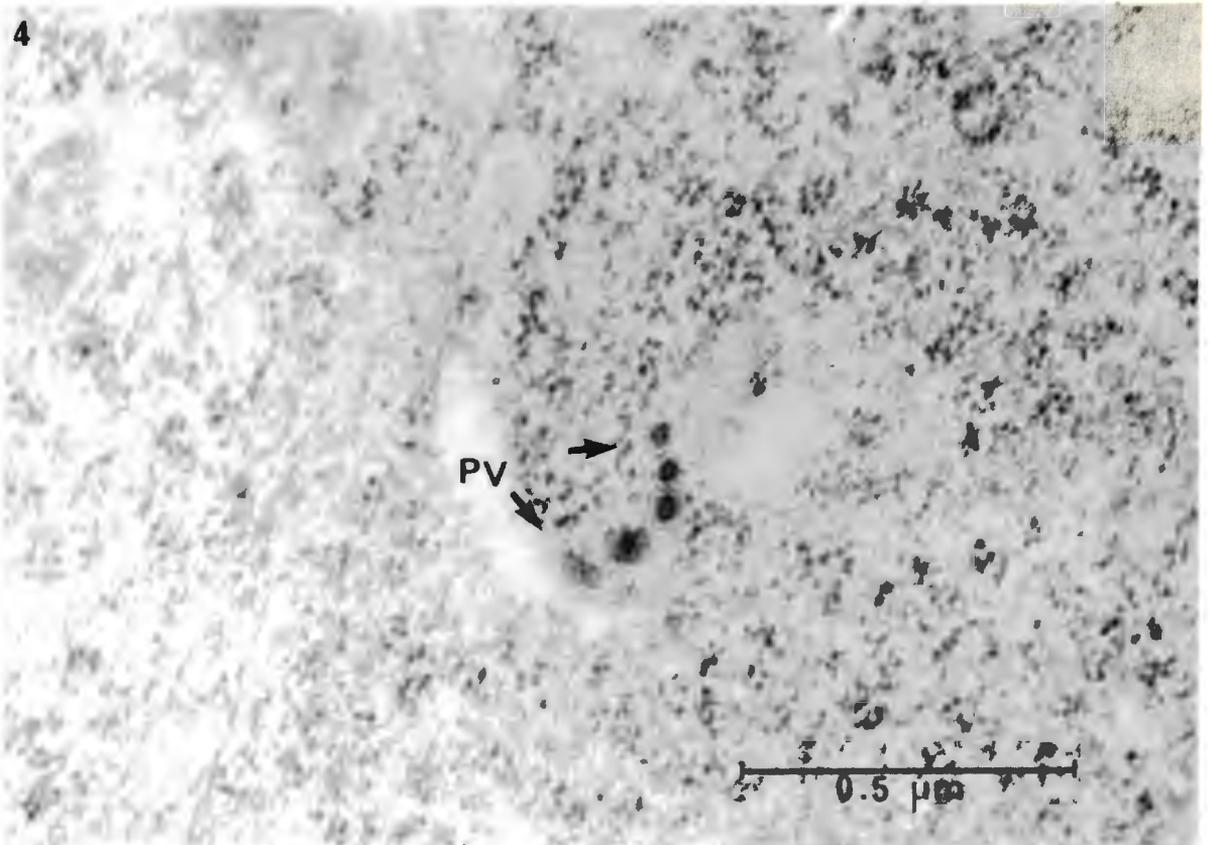
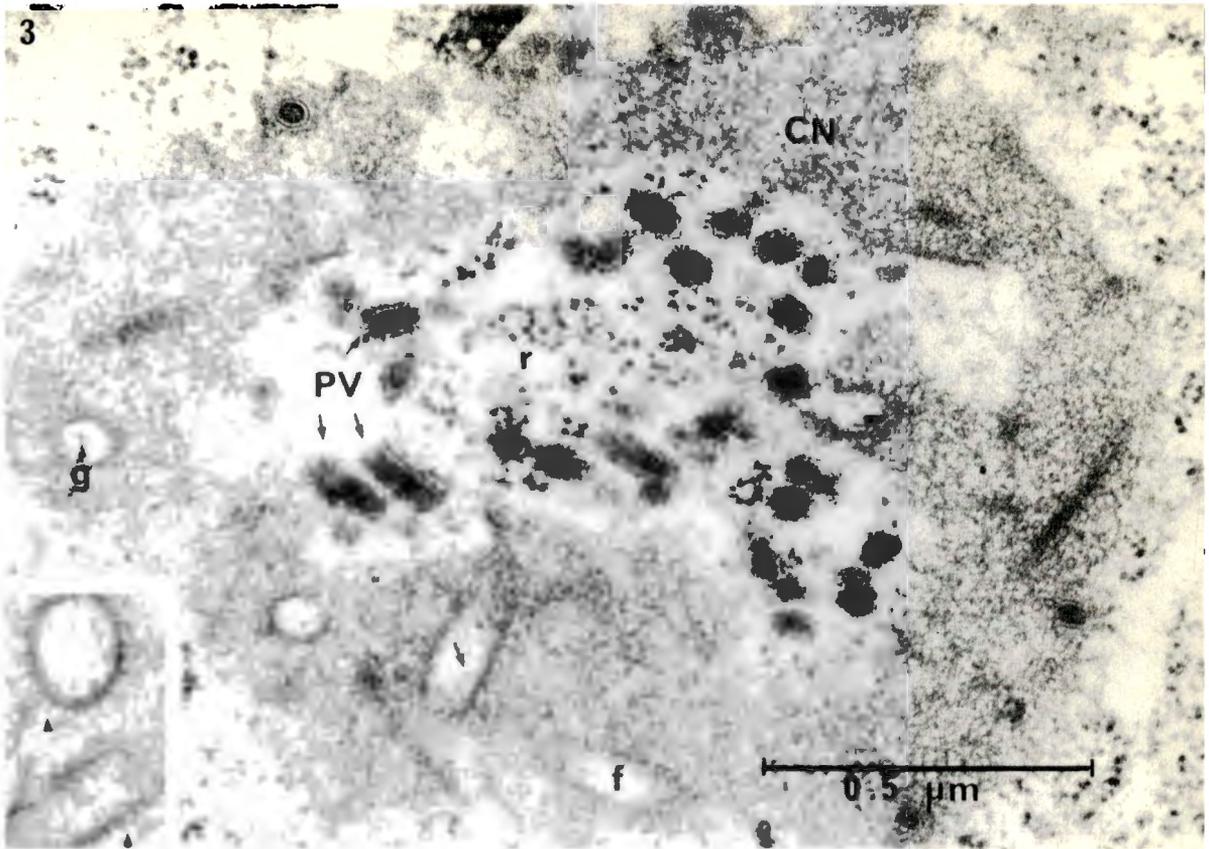


Figura no. 5A.- Micrografía electrónica del citoplasma de una neurona que muestra la presencia de una partícula viral (PV) con membrana fosfolipídica y cápside densamente teñida, además de la presencia de zonas fibrilares (zf). Uranilo-Plomo X 62,500

Figura no. 5B.- Micrografía electrónica que muestra el citoplasma de una neurona con la presencia de pequeñas zonas fibrilares (zf) y túbulos membranales (tm). Uranilo-Plomo X 62,500

Figura no. 6.- Micrografía electrónica de la inmunolocalización de un corpúsculo de Negri que muestra los gránulos de oro asociados a estructuras fibrilares, unidos a cisternas del retículo endoplásmico (RE) a fibrillas de la matriz y densificaciones del C.N. (flechas), también sobre los túbulos membranosos (cabeza de flecha). Uranilo-Plomo X 100,000

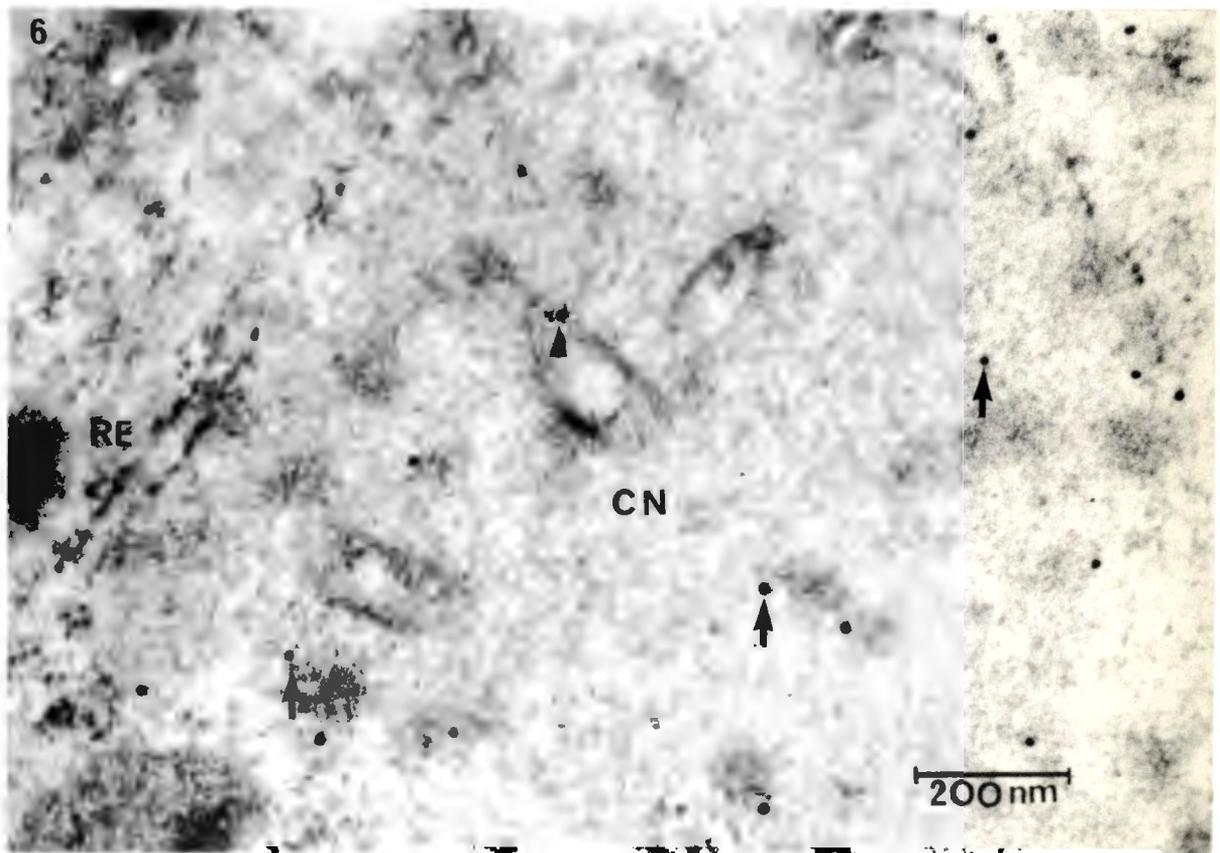
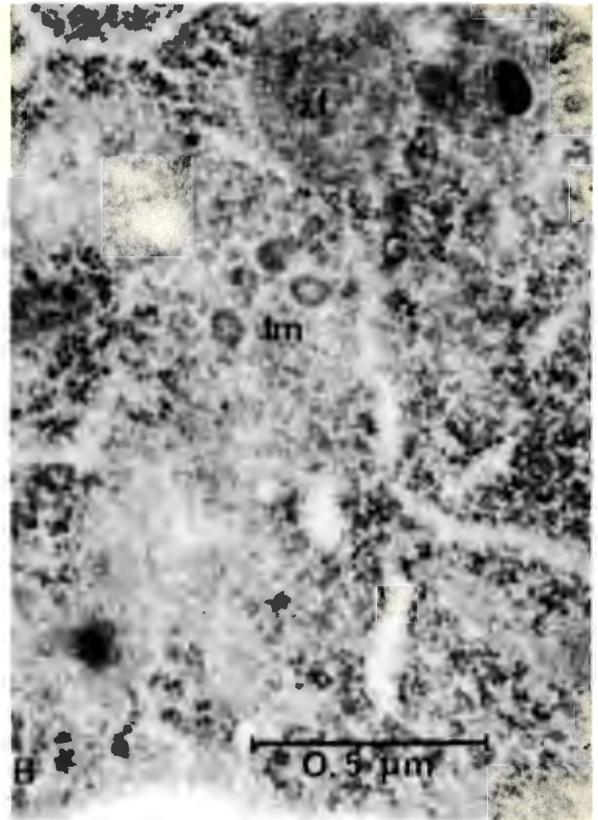
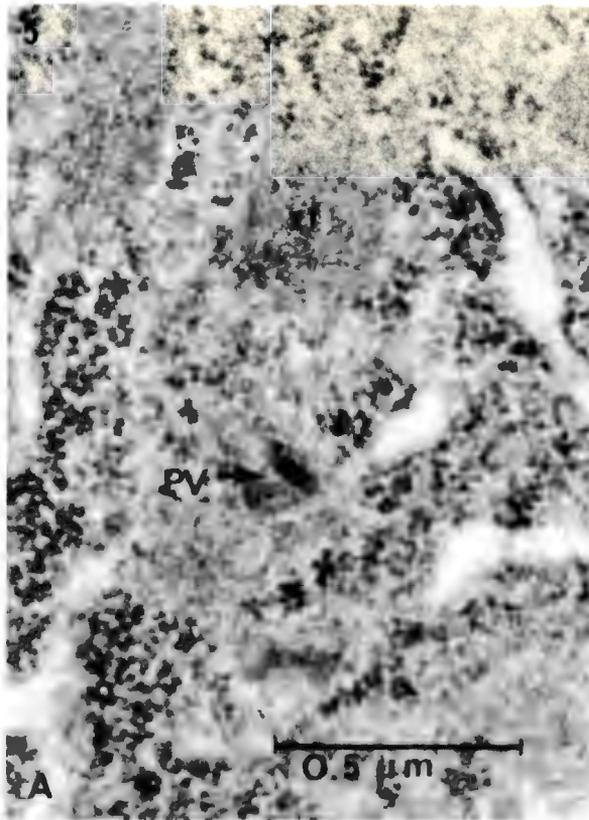


Figura no. 7.- Micrografía electrónica que muestra la inmunolocalización de un corpúsculo de Negri (CN) con gránulos de oro asociado a fibrillas situados entre los ribosomas cercano al C.N. (flechas) y la aparente nucleocápside desenrollada (cabezas de flecha). Uranilo-Plomo X 75,000

Figura no. 8.- Micrografía electrónica que muestra la inmunolocalización de un corpúsculo de Negri con marca en los túbulos membranosos (t) a las fibrillas y ribosomas cercano al C.N. Uranilo-Plomo X 100,000

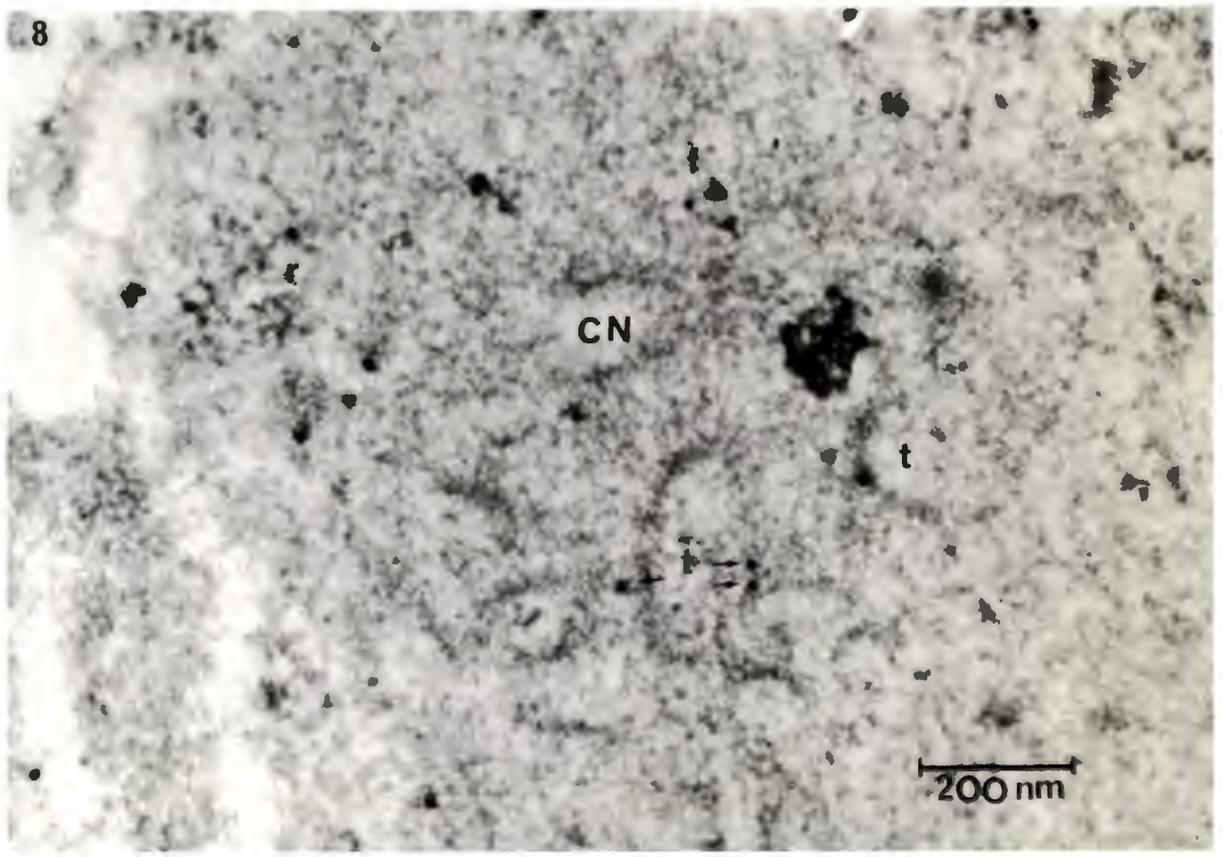
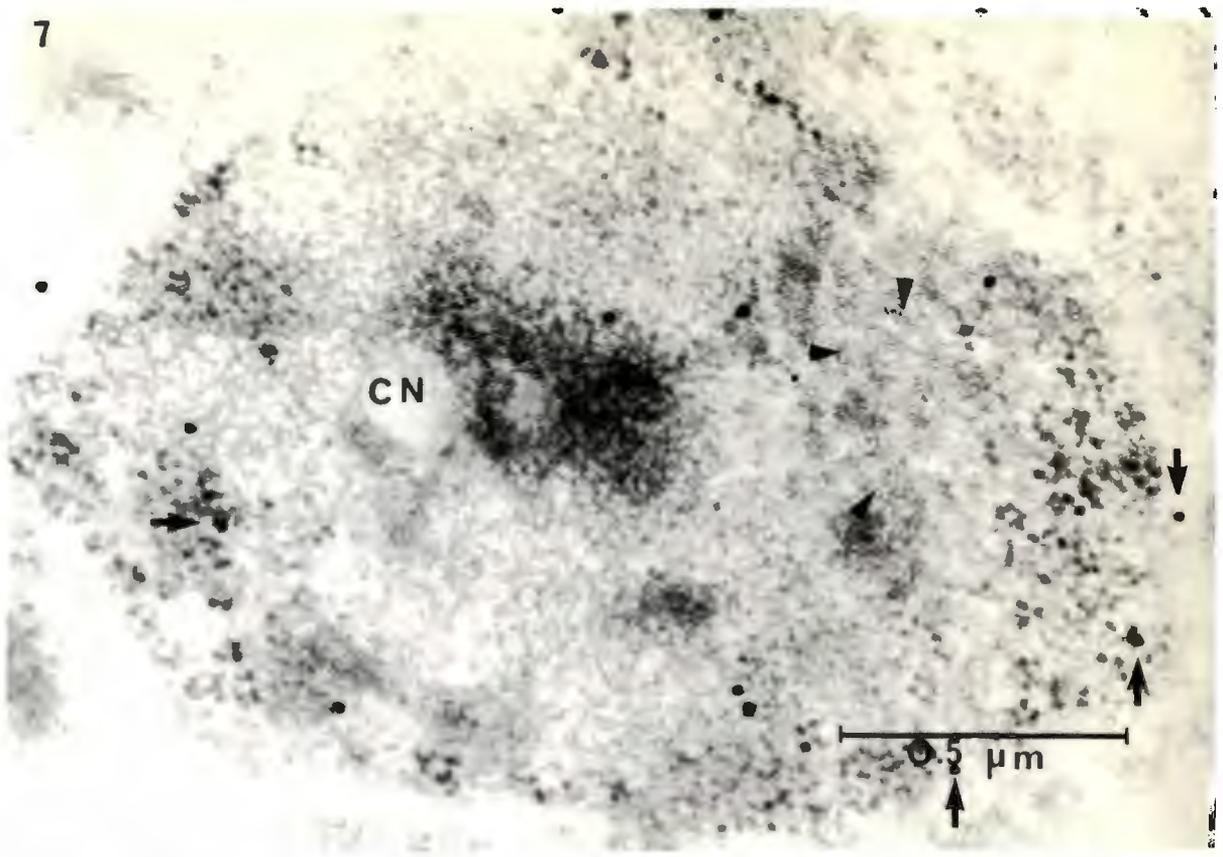
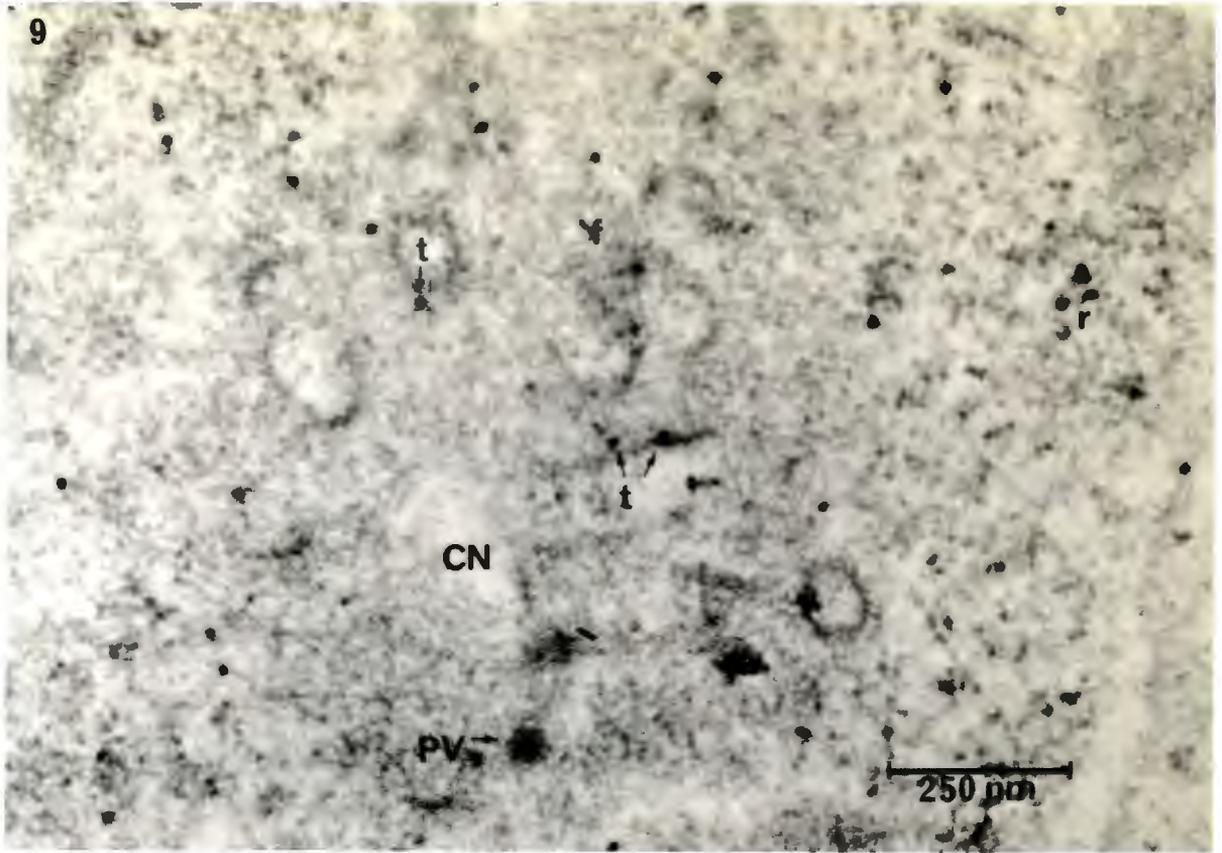


Figura no. 9.- Micrografía electrónica de la inmunolocalización que muestra la presencia de un corpúsculo de Negri (CN) con marca asociada a los filamentos externos de los túbulos membranosos (t) a las fibrillas y ribosomas cercanos al C.N. además de la presencia de una partícula viral (PV). Uranilo-Plomo X 95,000



D I S C U S I O N

La muerte temprana de los ratones inoculados posiblemente se debió a traumatismos o infección bacteriana ya que ha esta edad están predispuestos a todo tipo de infección (Kroprowsky,1966).

Los resultados del análisis morfológico del SNC de los ratones inoculados con virus rábico demuestran la existencia de neuronas normales y una progresión de alteraciones desde neuronas con virus sin otros cambios estructurales, pequeñas zonas fibrilares sin virus, hasta grandes zonas matrices con virus. Esta progresión ultraestructural corresponde a los diferentes estadios de evolución de la partícula viral de acuerdo a lo descrito (Atanasiu,1970; Hernández, 1972; Hernández, 1987; Shope,1985) .

Las zonas fibrilares o matrices están rodeadas por ribosomas y a veces interrumpidas por ellos, lo que es signo de coalescencia de varias matrices que han atrapado parte de los ribosomas periféricos en su interior. Debido a la presencia de ribosomas este tipo de regiones son basófilas. Estos resultados concuerdan con lo citado (González y Steephano, 1984; Makonnen, 1988). Estas matrices o regiones fibrilares no siempre corresponden a los corpúsculos de Negri de la microscopía óptica pues suelen ser más frecuentes que aquellos (Matsumoto, 1963). Probablemente las regiones fibrilares grandes y con ciertas propiedades tintoriales sean vistas en microscopía óptica como corpúsculos de Negri. Sin embargo, en este estudio nos referimos a estas regiones como corpúsculos de Negri en forma general.

Los túbulos membranales de los que parten pequeños filamentos hacia el exterior y el interior, son estructuras frecuentemente halladas durante el estudio de las regiones fibrilares. Estas estructuras que se asemejan a los virus pero carecen de la densidad central, son similares a las vistas por Matsumoto (1963), quien las describió pero no las interpretó. A la luz del conocimiento molecular moderno de los virus rábicos (Wunner y Larson, 1988), estos túbulos están formados por fragmentos de membrana de la neurona, probablemente separados del retículo

endoplásmico, en los que están insertadas la glicoproteína de 67 kDa de los peplómeros hacia el exterior y la proteína de 26 kDa o proteína matriz hacia el interior. Sin embargo, la nucleocápside ribonucleoproteica, que le otorga el aspecto denso central al virus completo, no está presente en estos túbulos.

La inmunolocalización nos muestra la síntesis de proteínas virales en los polisomas, lugares de síntesis de dichas proteína que aún no se han agrupado y estructurado. Estas etapas tan tempranas de formación viral no son demostrables por otras técnicas, ni aún por la morfología ultraestructural utilizando el microscopio electrónico. Las fibrillas delgadas de las regiones fibrilares o matrices se unen al anticuerpo demostrando la naturaleza viral de algunas de sus proteínas. Los virus presentan frecuentemente marca de tipo granular como era previsible dada la abundancia de antígenos en sus componentes. Es digno de mención que los túbulos membranales dieron marca con ambos sueros (primario y secundario), lo que indica la presencia de proteínas virales asociadas a la membrana. Por estas razones los túbulos pueden interpretarse como una etapa en la formación del virus o como restos de formaciones fallidas e incompletas.

Evaluación de las técnicas empleadas

El glutaraldehído como agente fijador para estudios biológicos de microscopía electrónica se debe a Sabatini y col. (1963). Karlsson y Schultz (1965) encontraron que la fijación del sistema nervioso central con glutaraldehído preservó la estructura fina, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, que se utilizó al 2.5% amortiguado con fosfatos (0.16 M y pH de 7.2). En el caso de los incluidos en LRW, se utilizó el glutaraldehído al 2.5% mas paraformaldehído al 4%, así como paraformaldehído al 4% solamente con amortiguador de fosfatos.

Cuando al fijador se le añadió goma arábiga, los tejidos mostraron membranas rotas, perforaciones y rupturas de los organelos celulares, lo cual difiere a lo descrito por Ubaldo,(1977) que la utilizó para producir tensión oncótica e impedir que el agua penetre a través de las membranas celulares evitando por lo consiguiente la salida de proteínas. Estas diferencias pudieran deberse a que en el presente trabajo se fijó por inmersión y en el anterior se perfundió por el árbol vascular del animal la mezcla fijadora.

.En cuanto a la técnica de inmunolocalización indirecta, las mejores imágenes se obtuvieron en ausencia de formvar, ya que éstas al reaccionar con los anticuerpos provocaba ruido de fondo (marca inespecífica). La incubación en este caso fué de 1 h a temperatura ambiente en lugar de lo comúnmente utilizado en esta técnica que es de 17 h a 4^oC.

Se demostró con los anticuerpos utilizados, la presencia de los epitopos antigénicos in situ como lo cita Davies (1963) en las diluciones 1:10 000 y 1:20 000 de los anticuerpos primarios (inmunoglobulinas contra rabia producidas en humano OBEM 09 y en equino) que fueron las que dieron mejores resultados..

C O N C L U S I O N E S

En el análisis morfológico ultraestructural, al microscopio electrónico se visualizó la presencia de los corpúsculos de Negri, así como de partículas virales en diferentes estadios y posiciones dentro de las neuronas.

La inmunolocalización indirecta demostró la presencia de las proteínas virales asociadas a los ribosomas, en la matriz fibrilar de los corpúsculos de Negri, en los virus completos y en retículo endoplásmico rugoso. Este último hallazgo no ha sido reportado anteriormente. Este método ha permitido demostrar por primera vez las etapas iniciales de la lesión en las neuronas a través de la visualización de los sitios de la síntesis de las proteínas virales en los ribosomas.

L I T E R A T U R A C I T A D A

Aguilar S.A., Pierre P.P, Oros C.D., Kretschmer R.: Anticuerpos Monoclonales en Rabia. Simposio Avances en el uso de vacunas 1885-1985 32-53 México 1986

Atanasiu P.: La Rage Experimentale et le Virión Rabique Bulletin de Linstitu Pasteur.T 68 no.9 2047-2068. 1970

Aviles M.J.: Diagnóstico y Prevención de la Rabia Humana. ed.Joma, S.A. 17-27 Mex. 1981

Baer M.G.: The natural history of rabies vol. 1a. ed. Academic Press Inc. U.S.A. 1975

Charlton, K.M.: The Patogenesis of Rabies. Rdited. by:James

B., Campbell and K.M. Charlton. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, United States of America 101-150 1988.

Correa, G.P.: La Rabia, Manifestaciones Clínicas, Transmisión, Prevención y Tratamiento. Virología Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarías S.A.Á.H. En Ciencia Veterinaria, Vol.III editado por R.Moreno Chan U.N.A.M. 104-124 México 1981.

Davies M.C.: The Electron Microscopy of Rabies in cultures of Chicken Embryo Tissues. Vurology 21 642-651 1963

Donnelly Roberts DL, Lentz T.L.:Structural and Conformational Similarity Between Synthetic peptides of Curaremimetic Neurotoxins and Rabies Virus Glicoprotein. Mol. Brain Research 11 (2) 107-113 1991

Fenner F. y White.: Virología Médica 2a. ed. Reimpresión México 384-389 1987.

Fenner F. y White.: Virología Médica 3a. ed. México S.A. de C.V. 427-431 1988

González S.C., Steephano H.A.: Estudio Histopatológico del Sistema Nervioso Central de Caninos Positivos a Rabia. Veterinaria México 15 39-52 1984

Hagan W.A. Bruner D.W.: Enfermedades Infecciosas de los animales Domésticos. Ed. Prensa Médica Mexicana. México 689-703 1975

Hérrnandez, B.E.: Comparative Electron Microscopie Studies of the Virus-Cell Interactions Associated with Several culture Adapted strains of Rabies Virus. Tesis Doctoral 1972

Hérrnandez J.P.: Patogenia de la Infección Rábica en el Hombre y los Animales. Memorias Simposio, la Atención Médica de las Personas Involucradas en un Incidente de Rabia. México 120-127 O.P.S. 1987

Hutyra, Marek y Meninger.: Patología y Terapeútica Especial de los Animales domésticos. Tomo 1., 8a. Ed. 7o. 401 1959

Jubb K.V.F. & Kennedy P. Patología de los Animales Domésticos. Tomo 11 ed. Labor. Barcelona 491-493 1974

Karlsson, U., and Schultz L.R.: Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. I. Preservation with aldehyde, perfusates versus direct perfusion with osmium tetroxide with special reference to membranes and the extracellular space. J. Ultrastruct. Res., 12 160-186 1965

King, Arthur and Crick J.: Rabies-Related Viruses. In; Rabies. Edited by: James B. Campbell and K. M. Charlton. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, United States of America, 1988. 177-200

Koprowski, H.: Mouse inoculation Test. Laboratory Techniques in Rabies. Second Edition. World Health Organization.. Geneva 1966 69-80

Larghi O.P.: Pruebas de Anticuerpos Fluorescentes para Rabia. Centro Panamericano de Zoonosis, Oficina Sanitaria Panamericana. Nota Tec. No. 8 Rev. 2 1975

Lepine, P.: Methodological Diagnosis. Laboratory Techniques in Rabies. Second Edition. World Health Organization. Geneva 1966 42-58

Llamas L.L. y Escobar A.: Rabia; infección viral del sistema nervioso central comentario de sesión clínico patológica no. 7 México. 1986

López B.B. y Hernández B.: 1975 Pruebas de potencia para vacunas antirrábicas del virus vivo modificado de origen de cultivos celulares. Tec. Pec. Méx. 29:105

Makonnen F.: Patogenesis of rabies virus infection in dogs. Reviews on infectious Diseases vol. 10 supplement 4 november-deceber 1988 S678-S683

Matsumoto Sellchi, M.D.: Electron Microscope Studies of Rabies Virus in Mouse Brain. Cell Biol. Vol. 19 1963 565-591

Mohanty. Dutta.: Virologia Veterinaria ed. Interamericana México 1983

Romano, E.L. Romano M.: Immunolabelling for Electron Microscopy. Cap. 1 El Sevier Science Publishers B 28-43

Sabatini, D.D, Bensch, K. and Barnett R.J.: Cytochemistry

and Electron Microscopy the Preservation of Cellular
Structure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation.
J.Cell Biol. 17 19 (1963)

Salido, R.F.: Relaciones Serológicas del Virus de la Rabia
con Otros Virus. Salud Pública de México Epoca V. Vol. XVI
No. 3 1974 351-355

Salido, R.F.: Patología y Patogenia. Salubridad Pública
México XVI, 3 361-363 1974

Schuneman de A. Casaubon M.T. Sánchez S.R.: Patología
Sistémica Veterinaria. Fac. de Med. Ve y Zoot. vol.11 México
1990 273-277

Shope R.: Advances in Rabies virus research. Veterinary
Viral Diseases 361-373 1985

Steele, H.J.: Historia de la Rabia En Historia Natural de la
Rabia. Editado por George M.Baer, Primera Edición, La Prensa
Médica Mexicana, México 1982 1-30

Tierkel, S.E.: Rabia Canina en Historia Natural de la Rabia editado por George M. Baer 2a. ed. La Prensa Médica Mexicana 32-38 1982

Tierkel, S.E.: Técnicas de Laboratorio Aplicadas a la Rabia Organización Mundial de la Salud No. 23 Reimpresión 1959 32-35

Ubaldo P.E.- Estudio Experimental Sobre los Métodos de Fijación del SNC para su Estudio Ultraestructural. Tesis de Licenciatura U.N.A.M. 1977 29-32

Voigh A., Kleimer F.D.- Zoonosis Editado por Acriba Zaragoza 1975 150, 252-256

Wunner W.H. y Larson J.K.: The Molecular Biology of Rabies Viruses Reviews of Infectious Diseases Vol. 10 Supplement 4 november-december 1988 S771-S784