

PATOLOGÍA COMPARADA DE LESIONES PRODUCIDAS CON VARIANTES MOLECULARES DEL VIRUS DE LA RABIA QUE CIRCULA EN MÉXICO

COMPARATIVE PATHOLOGY OF THE LESIONS PRODUCED BY MOLECULAR VARIANTS OF THE RABIES VIRUS THAT ARE CIRCULATING IN MEXICO

JOSÉ ERNESTO WEIMERSHEIMER R*(MVZ), ELIZABETH LOZA-RUBIO*(MVZ; MCV),
ELIZABETH MORALES S** (MVZ; MCV).

ABSTRACT

A third rabies cycle, hypervariable, circulating in skunks which can vary its genome as much as 19% with respect to the terrestrial and aerial cycles has been recently identified in Mexico by molecular studies; restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequencing. The purpose of this study was to know whether relevant histopathologic differences produced by the three epidemiological cycles of rabies virus could be determined. Six CD-1 strain mice were inoculated intracerebrally with a strain of each of the three cycles (1,2,3 Groups). The positive control (Group 4) was inoculated with CVS, and the negative control (Group 5) with a mouse brain suspension. Three inoculations for all groups were made. Fluorescent antibody tests were run to all brains. Histopathologic studies showed rabies positive results in animals inoculated with the three different cycle strains as well as the positive control group. Mice inoculated with the brain suspension (Group 5) were negative. Group 1 (terrestrial cycle) showed the following lesions on the CNS (Central nervous system): Non-suppurative encephalitis with moderate to severe perivascular lymphocytic infiltration affecting hippocampus and the thalamus region. Intracytoplasmic eosinophilic inclusions in neurones (Negri corpuscles), slight microgliosis and vacuoles of various sizes in the neurophila, resembling espongiosis, were also found. Brains of animals inoculated with aerial, terrestrial or hypervariable strains showed similar lesions. For mice in Group 3 (hypervariable), however, no espongiosis or Negri corpuscles were found. Encephalitis appeared to be more severe on brains in Group 3 (hypervariable) when compared to the other experimental groups. Groups 5 (negative control) showed no changes. There was no neuronofagia in any of the brains of the experimental groups. The incubation period in Group 3 was also shorter (9 days) than that of other groups (11 days). The virus isolated from skunks produced more severe brain lesions in mice. These findings suggest that genetic variations for cycle may in turn produce pathogenic differences in mice. Espongiosis and Negri corpuscles found in Group 1, but not in groups 2 or 3 were evidence of more aggressive brain lesions, which may primarily indicate the viral cycle involved in a case, or rabies outbreak.

KEY WORDS: Rabies virus, Cycles, Histopathologic, Encephalitis, Molecular variants.

PALABRAS CLAVE: Rabia, virus, ciclo, histopatológico, encefalitis.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se conoce que en Latinoamérica aproximadamente el 74.8% de la gente habita en áreas urbanas. Durante 1997, 50.5% de los casos de rabia en humanos ocurrieron en áreas rurales (Bolet. Vig. epidem, 1997). En estas regiones las interacciones de la población y los animales domésticos

* Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. SAGARPA. Carretera México/Toluca, Km. 15.5, Col. Palo Alto, CP 05110, México DF. Correo electrónico: weimer@micro.inifap.conacyt.mx

** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria. Departamento de Patología Animal.

con las diferentes especies silvestres se ha incrementado. Esto ha hecho que los ciclos urbanos y silvestres se hayan traslapado, complicando el entendimiento de la epidemiología de la rabia, su control y presentación de la enfermedad en sí; por lo que la identificación del actual curso de la infección de casos de rabia en humanos y animales domésticos se ha tornado crítica para determinar específicamente la transmisión y el establecimiento de la relación epidemiológica entre los casos y los brotes (De Mattos *et al.*, 1999).

En los últimos años con el uso de la biología molecular, los progresos sobre rabia han sido considerables (Tordo *et al.*, 1986), (Tordo *et al.*, 1988). En México, mediante estudios moleculares usando el polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP) y la secuenciación de fragmentos de los genes G y N (Bahloul, 1997), (Loza-Rubio *et al.*, 1998), (Loza-Rubio *et al.*, 1999), (De Mattos *et al.*, 1999), se ha determinado la presencia de ciclos endémicos de rabia no descritos previamente; además de un ciclo que se presenta en zorros del norte de México, se identificaron dos ciclos que circulan en zorrillos provenientes de Baja California Sur y del Altiplano central del país (Aguascalientes y San Luis de Potosí), a los que se le denominó hipervariables (Loza-Rubio, 1999); especialmente el que se encuentra presente en el Norte del país (Baja California Sur) varía casi en un 19% en su genoma con respecto a los ciclos conocidos como el terrestre, cuyo reservorio principal a nivel urbano es el perro, y el aéreo cuyo agente transmisor generalmente es el murciélago hematófago (Smith Baer *et al.*, 1988), (Perl *et al.*, 1988). Además con ambos genes se demostró que las variantes de virus rábico aislados de zorrillos de México son diferentes a los de Kansas y California en los Estados Unidos.

Conociendo esta situación, en la actualidad se realizan diferentes estudios empleando muestras positivas a rabia provenientes tanto de fauna doméstica como silvestre, con el propósito de caracterizar biológicamente a las variantes del virus de la rabia que se encuentran dentro del sero/genotipo 1, que es el que se ha detectado en el país de ciclo terrestre proveniente de un gato montés, Grupo 2 de ciclo aéreo (murciélago hematófago), Grupo 3 de ciclo hipervariable (zorrillo), Grupo 4 es el de control positivo inoculado con CVS (Challenge Virus Strain) y el Grupo 5 como control negativo inoculados con suspensión de cerebro normal. El período de incubación fluctuó entre

el noveno y onceavo días, encontrándose en un estado agónico 2 a 3 días posteriores al inicio de la presentación de los signos clínicos. A todos los ratones muertos se les corrió la prueba de inmunofluorescencia antes del estudio histopatológico. Al estar en estado paralítico total y en estado agónico, se sacrificaron mediante una exposición prolongada al cloroformo para obtener el cerebro y desarrollar la prueba de inmunofluorescencia y el estudio histopatológico. Para el estudio histopatológico los cerebros se fijaron en formalina bufferada al 10%, se trabajaron con la técnica histológica de inclusión en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H.E.) para identificar lesiones características de rabia, revisándose las siguientes zonas anatómicas de cada cerebro: hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, puente y región talámica.

RESULTADOS

Los ratones pertenecientes al Grupo 1 (ciclo terrestre) presentaron las siguientes lesiones en el sistema nervioso central: en todos los casos se apreció encefalitis no supurativa caracterizándose por infiltrado linfocitario perivascular de moderado a severo afectando solo el hipocampo y la región talámica; además se encontraron inclusiones eosinofílicas intracitoplásmáticas en las neuronas (corpúsculos de Negri), microgliosis leve, y presencia de vacuolas de diferentes tamaños en la neurópila dando el aspecto de espongirosis. Los ratones pertenecientes al Grupo 2 (ciclo aéreo) presentaron las siguientes lesiones: infiltrado perivascular siendo de leve a moderado en el cerebelo y corteza cerebral, y severo en hipocampo, región talámica y puente, además de microgliosis leve. No se encontró espongirosis ni corpúsculos de Negri. Los ratones del Grupo 3 (ciclo hipervariable) presentaron las siguientes lesiones: infiltrado linfocitario perivascular siendo de moderado a severo en cerebelo, corteza cerebral y puente, y severo en hipocampo y región talámica, así como microgliosis leve. No se apreció espongirosis ni corpúsculos de Negri. En los ratones del Grupo 4 (CVS) se apreció lo siguiente: infiltrado linfocitario perivascular, siendo de leve a moderado en cerebelo, corteza cerebral y puente y severo en hipocampo y región talámica, así como microgliosis leve. Tampoco se apreció espongirosis ni corpúsculos de Negri. Los ratones pertenecientes al

Grupo 5 no presentaron alteraciones. Cabe mencionar que en ninguno de los grupos experimentales se apreció neuronofagia.

DISCUSIÓN

Las lesiones encefálicas encontradas en los 4 grupos inoculados con diferentes cepas de virus rábico fueron características de la enfermedad. El hipocampo y región talámica fueron las regiones que presentaron lesiones más severas, sin embargo puede apreciarse que existen algunas diferencias en estos grupos, por lo que se puede deducir que la patogenicidad de cada cepa de virus rábico se comporta de manera diferente en forma experimental, siendo las diferencias básicas las siguientes: los ratones inoculados con el virus de origen terrestre fueron los únicos en donde se apreció espongirosis en la neurópila y corpúsculos de Negri, además de que sólo se apreciaron lesiones en hipocampo y región talámica sugiriendo un tropismo del virus principalmente hacia estas regiones. Estudios experimentales previos indican que las vacuolas se forman en la infección temprana en las dendritas y menos frecuentemente en axones y astrocitos, y se considera que estas vacuolas intracitoplasmáticas se agrandan hasta provocar la ruptura de la membrana plasmática formando finalmente pequeños espacios en la neurópila (Jackson 1994), (Charlton 1994). También se ha documentado que estas vacuolas se han observado después de la infección por diferentes cepas o variantes antigénicas y moleculares del virus rábico, independientemente de la respuesta inmune, ruta de inoculación o preparación del virus (De Mattos *et al.* 1999). Por otro lado, se sabe que no en todos los casos de encefalitis rábica se aprecian corpúsculos de Negri al microscopio de luz; en pacientes humanos con rabia éstos se observan aproximadamente en el 70% de los casos (Jackson 1994). En los encéfalos de los ratones pertenecientes al Grupo 3 (ciclo hipervariable) la encefalitis rábica se apreció más severa con respecto a los demás grupos experimentales pudiendo indicar que esta cepa de virus es capaz de estimular en forma más eficiente al sistema inmunitario del huésped. Cabe mencionar que los encéfalos del Grupo 2 (ciclo aéreo) y los del Grupo 4 (CVS) mostraron lesiones similares indicando aparentemente un comportamiento semejante de estos virus. Por otro lado, se ha documentado que la infección neuronal

por virus rábico no necesariamente provoca cambios citopáticos, por lo que en todos los casos se observa microgliosis manifiesta y neuronofagia, como lo observado en los grupos experimentales y el testigo positivo de este estudio (Charlton 1997). Cabe mencionar que el período de incubación fue menor con la cepa del ciclo 3 o hipervariable (9 días) que en los ratones inoculados con las cepas de los otros dos ciclos y el control positivo, en los que el período de incubación fue de 11 días.

Las lesiones microscópicas producidas por el virus rábico en el SNC en las diferentes especies animales ya han sido descritas ampliamente resumiéndose en las siguientes: polioencefalomielitis, la cual se caracteriza por diferentes grados de infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular, diferentes grados de microgliosis y neuronofagia, la presencia de inclusiones virales eosinofílicas intracitoplasmáticas conocidas como corpúsculos de Negri y, en ocasiones, leptomeningitis. Se sabe que los cambios neuropatológicos producidos por las diferentes cepas de virus rábico varían y frecuentemente no se relacionan con los signos clínicos de la enfermedad (Jackson, 1997). Estas lesiones se encuentran principalmente en corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, región talámica y puente (Jackson, 1997). La presencia de lesiones espongiiformes caracterizadas por vacuolación de la neurópila en la sustancia gris, se detectó inicialmente en casos de rabia experimental en zorrillos y zorros y posteriormente en forma espontánea en éstos y otros animales.

RESUMEN

En México se ha identificado recientemente mediante estudios moleculares (RFLP y Secuenciación) un tercer ciclo de rabia que circula en zorrillo (hipervariable) y que puede variar hasta en un 19% en su genoma con respecto a los ciclos terrestre y aéreo. Por lo expuesto anteriormente, el objetivo del trabajo fue el conocer si hay diferencias histopatológicas relevantes producidas por el virus de la rabia proveniente de los 3 ciclos ya mencionados. Para esto se inocularon por vía intracerebral 6 ratones, cepa CD 1 con cada una de las cepas de cada ciclo, más un grupo testigo positivo con CVS, (Grupos 1, 2, 3, y 4), y otro con suspensión de cerebro normal de ratón como testigo negativo (Grupo 5)

con 3 repeticiones para cada uno de los grupos en estudio. A todos los cerebros obtenidos de cada uno de los animales se les realizó la prueba de inmunofluorescencia directa. En el estudio histopatológico resultaron positivos los animales inoculados con las 3 diferentes cepas provenientes de los diferentes ciclos, así como el testigo positivo. Los animales inoculados con la suspensión de cerebro normal resultaron negativos. Los ratones del Grupo 1 (ciclo terrestre), presentaron las siguientes lesiones en el Sistema Nervioso Central: Se apreció encefalitis no supurativa caracterizándose por infiltrado linfocitario perivascular de moderado a severo afectando sólo el hipocampo y región del tálamo; además se encontraron inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en las neuronas (corpúsculos de Negri), microgliosis leve así como vacuolas de diferentes tamaños en la neurópila dando el aspecto de espongiosis. Los ratones inoculados con cepa de origen aéreo, terrestre e hipervariable, presentaron lesiones similares pero no se encontró espongiosis ni corpúsculos de Negri. En los encéfalos de los ratones pertenecientes al grupo 3 (ciclo hipervariable) la encefalitis rábica se apreció más severa con respecto a los demás grupos experimentales. Los ratones pertenecientes al grupo 5 no presentaron alteraciones. En ninguno de los grupos experimentales se apreció neurofagia. El período de incubación en el grupo 3 fue menor (9 días) en comparación con los otros 3 grupos positivos (11 días); así mismo, el virus proveniente de zorrillo produjo lesiones encefálicas más severas en los ratones, por lo que sugiere que los cambios genéticos encontrados en cada ciclo pueden producir diferencias en la patogenicidad del virus en los ratones. El no haber encontrado espongiosis ni corpúsculos de Negri en los grupos 2 y 3 pero sí en el grupo 1, demuestra que el ciclo terrestre fue más agresivo en cuanto a las lesiones encefálicas producidas, lo que nos puede dar un indicio primario acerca del ciclo participante en un caso o en un brote de rabia.

REFERENCIAS

- VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA RABIA EN LAS AMÉRICAS. 1997. Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas. Volumen 29. Washington DC. Pan American Health Organization and Geneva: World Health Organization (WHO).
- DE MATTOS CC, DE MATTOS CA, LOZA-RUBIO E, AGUILAR A, ORCIARI L, SMITH J. 1999. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: Implications for transmission dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg.* Vol. 6 P: 587-597.
- TORDO N, POCH O. 1986. Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucl. Acids Res.* Vol. 14: 2671-2683.
- TORDO N, POCH O, ERMINE A, KEITH G, ROUGEON F. 1988. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains along the L (polymerase) proteins of unsegmented negative strand RNA viruses. *Virology.* 165. P: 565-576.
- BAHLOUL CH. 1997. Immunisation Génétique Immunogénétique de la glycoprotéine Rabique et vaccins élargis aux Lyssavirus. These présentée à l'Université de formation et de recherche, Université de Paris pour l'obtention du grade de Docteur, Paris. P: 181.
- LOZA-RUBIO E, PEDROZA R R, MONTAÑO H J A, AGUILAR SETIÉN A. 1998. Caracterización con anticuerpos monoclonales del virus de la rabia aislado de fauna doméstica y silvestre de México. *Vet. Méx.*; 29: 245.
- LOZA-RUBIO E, AGUILAR SA, BAHLOUL CH, BROCHIER B, PASTORET PP TORDO N. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. *ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH.* 30. P 144-149.
- SMITH J, BAER GM. 1988. Epizootiology of Rabies in the Americas In: Cambell JB, Charlton KM editors. Rabies. Boston: Kluwer Academic Publishers. P: 267.
- PERL DP. The pathology of rabies in the central nervous system. In: Baer GM (ed). The natural history of rabies. Academic Press, New York. 1988. P: 235-272.
- SMITH JS, MCLELLAND CL, REID LF AND BAER GM. 1982. Dual role of the immune response in street rabies virus infection of mice. *Infection and immunity.* 35: 213-221.
- JACKSON AC. 1994. Animal models of rabies neurovirulence, Lyssaviruses; eds Ruprecht CE, Dietzschold B, Koprowski H, Springer-Verlag, Berlin. P: 85-93.
- CHARLTON KM. Rabies; spongiform lesions in the brain. *Acta neuropathol.* (Berlín). 1994, 63: 198-202.
- JACKSON AC. 1997. Rabies. In: Viral pathogenesis. (Nathanson N. ed). Lippincot-Raven publishers, Philadelphia. P: 575-591.