

2022

Efecto de la infección con virus del Zika en la expresión de los marcadores de células gliales GFAP Y S100 β en el cerebelo de ratones neonatos.

Laura Milena Perez Herrera
Universidad de La Salle, Bogotá, lperez63@unisalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Perez Herrera, L. M. (2022). Efecto de la infección con virus del Zika en la expresión de los marcadores de células gliales GFAP Y S100 β en el cerebelo de ratones neonatos.. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/139>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON VIRUS DEL ZIKA EN LA EXPRESIÓN DE LOS
MARCADORES DE CÉLULAS GLIALES GFAP Y S100 β EN EL CEREBELO DE
RATONES NEONATOS.**

Laura Milena Pérez Herrera

Universidad de La Salle

Departamento de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Bogotá D.C, Colombia

2022

**EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON VIRUS DEL ZIKA EN LA EXPRESIÓN DE LOS
MARCADORES DE CÉLULAS GLIALES GFAP Y S100 β EN EL CEREBELO DE
RATONES NEONATOS.**

Laura Milena Pérez Herrera

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de biólogo

Tutor

Orlando Torres Fernández MSc, PhD
Coordinador, Grupo de Morfología Celular
Instituto Nacional de Salud.

Cotutor

Yenny Yolanda Lozano Jiménez, PhD
Docente, Programa de Biología

Universidad de La Salle

Departamento de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Bogotá D.C, Colombia

2022

AGRADECIMIENTOS.

En primera instancia agradezco a Dios por ser inspirador, guía y fortaleza en aquellos momentos de dificultad. Mi profundo agradecimiento al Doctor Orlando Torres (Tutor), por su esfuerzo, dedicación y apoyo brindado a este trabajo y por compartir su conocimiento conmigo. De igual manera quiero expresar mi agradecimiento a Minciencias y el Instituto Nacional de Salud (INS) por el financiamiento al proyecto 210474455818, convocatoria 777 de 2017; así mismo quiero agradecer a los integrantes del Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud por su colaboración para desarrollar los procedimientos necesarios en la ejecución de este estudio; y por supuesto, agradezco a mis padres y hermano por su apoyo, colaboración e inspiración a lo largo de mi carrera; por enseñarme que la perseverancia y esfuerzo son el camino para lograr objetivos. Finalmente, a la Universidad de la Salle, en especial al Programa de Biología por brindarme la oportunidad de cursar mi carrera universitaria y a la profesora Yenny Lozano (cotutora) por su apoyo y orientación.

Tabla de contenido

Resumen	6
Abstract	6
Introducción	7
Materiales y Metodos	13
Inoculación y manejo de animales de laboratorio	13
Estudio inmunohistoquímico	14
Morfometría.....	15
Resultados	17
Histología en el cerebelo de ratones control e infectados con ZIKV.....	17
Inmunorreactividad a GFAP en cerebelo de ratones control e infectados	18
Inmunorreactividad a <i>S100β</i> en cerebelo de ratones control e infectados.....	21
Discusión	25
Histología en el cerebelo de ratones control e infectados con ZIKV.....	25
Inmunorreactividad a GFAP en cerebelo de ratones control e infectados	25
Inmunorreactividad a <i>S100β</i> en cerebelo de ratones control e infectados.....	26
Comentario final.....	28
Conclusiones	29
Referencias	30

Listado de figuras

FIGURA 1. Cortes sagitales de cerebelo con coloración H&E.....	17
FIGURA 2. Inmunorreactividad de GFAP en cortes sagitales de cerebelo.....	19
FIGURA 3. Inmunorreactividad a S100 β en cortes sagitales de cerebelo.....	22
FIGURA 4. Diagrama obtenido a partir de los conteos de células inmunorreactivas a S100 β	24

Listado de tablas

TABLA 1. Densitometría de la inmunorreactividad a GFAP en las capas granular y molecular del cerebelo en ratones control e infectados con ZIKV	20
TABLA 2. Densitometría de la inmunorreactividad a S100 β en las capas granular y molecular del cerebelo en ratones control e infectados con ZIKV..... ¡Error! Marcador no definido.	23
TABLA 3. Distribución del número de células positivas para S100 β en la capa granular interna de cerebelos infectados con Zika y sus respectivos controles.....	24

Abreviaturas

ABSL2: Animal biosecurity level 2

DAB: Dianominobencidina

GFAP: Proteína ácido fibrilar de la glía

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

INS: Instituto Nacional de Salud

NH₄Cl: Cloruro de amonio

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

S100β: Proteína S100β

SNC: Sistema nervioso central

ZIKV: Virus del Zika

Resumen

Casi 70 años después de su descubrimiento en África, el virus del Zika (ZIKV) adquirió gran importancia en salud pública debido a que llegó a las Américas convertido en un neuropatógeno con gran afinidad por las células progenitoras del sistema nervioso. La infección puede ocasionar atrofia en el desarrollo prenatal del cerebro y el cerebelo de los fetos de madres que hayan adquirido el virus en los dos primeros meses de gestación. Aquí se presentan los resultados del estudio del efecto del ZIKV sobre la glía del cerebelo luego de inocular el ZIKV por vía intramuscular en ratones de un día de nacidos. Se comparó la expresión tisular de dos proteínas marcadoras de astrocitos, la GFAP y la S100 β , en la glía de Bergman y astrocitos parenquimales del cerebelo de ratones inoculados y no inoculados con el ZIKV. La infección generó aumento en la expresión de las dos proteínas en la capa molecular (glía de Bergmann) así como en la capa granular interna y en el área de los núcleos profundos (astrocitos parenquimales). La sobreexpresión de estas proteínas puede dar lugar efectos nocivos en el sistema nervioso debido a la estrecha relación funcional entre neuronas y astrocitos.

Abstract

Almost 70 years after its discovery in Africa, the Zika virus (ZIKV) acquired great importance in public health because it arrived in the Americas as a neuropathogen with great affinity for the progenitor cells of the nervous system. The infection can cause atrophy in the prenatal development of the brain and the cerebellum of the fetuses of mothers who have acquired the virus in the first two months of gestation. Here we present the results of the study of the effect of ZIKV on cerebellar glia after inoculating ZIKV intramuscularly in day-old mice. Tissue expression of two astrocyte marker proteins, GFAP and S100 β , was compared in Bergman glia and cerebellar parenchymal astrocytes of ZIKV-inoculated and non-inoculated mice. The infection generated an increase in the expression of the two proteins in the molecular layer (Bergmann glia) as well as in the internal granular layer and in the area of the deep nuclei (parenchymal astrocytes). Overexpression of these proteins can lead to deleterious effects on the nervous system due to the close functional relationship between neurons and astrocytes.

Introducción

El Zika es un virus de la familia Flaviviridae que se descubrió en 1947 en monos *Macacus* de la selva del Zika, en Uganda. Se caracteriza porque se transmite a través de la picadura del mosquito hembra de la especie *Aedes aegypti*. También se ha demostrado la transmisión vertical (madre a hijo) y horizontal por contacto sexual (Sharma et al., 2020). Después de 70 años con escasa figuración como enfermedad de importancia en salud pública, el virus llegó a Brasil probablemente desde las islas del Caribe, de allí se propagó rápidamente por todo el continente americano en donde el *A. aegypti* está ampliamente diseminado (Kindhauser et al., 2016; Metsky, 2017). Pero lo que generó alarma mundial fueron los efectos sobre el sistema nervioso, especialmente por el incremento de casos de microcefalia (Carod-Artal, 2016; Brady et al., 2019).

El país más afectado por este virus ha sido Brasil, según un análisis epidemiológico se calcula que desde el inicio de la epidemia en 2015 hasta mayo de 2017 se presentaron 8,5 millones de casos sintomáticos y 2791 casos de microcefalia, la mayoría de ellos concentrados en estados del noreste. En ese estudio también se estableció que la tasa de microcefalia asociada a Zika alcanzó los 40 casos por 10.000 nacimientos, superior a la de otros estados de Brasil y otros países afectados por la epidemia (Brady et al., 2019). Si bien a partir del año 2017 el Zika (como enfermedad) pasó de la fase epidémica a la fase endémica, con una marcada reducción en el número de casos, continúa siendo una amenaza para la salud pública, ahora eclipsada por la pandemia del COVID-19 (Pergolizzi et al., 2020).

En Colombia se alcanzó una tasa de infección de 377 por 100.000 habitantes. Durante los 18 meses transcurridos entre el segundo semestre del 2015 y diciembre

de 2016 se registraron 96.860 casos sospechosos por diagnóstico clínico, con 9.799 infecciones confirmadas por laboratorio. De ellas 6.363 correspondían a madres gestantes. En ese mismo periodo se confirmaron 77 casos de microcefalia y otros defectos congénitos del sistema nervioso central (SNC) asociados al virus del Zika. Igualmente, a diciembre de 2016 se habían notificado 677 casos clínicos de síndromes neurológicos (Síndrome de Guillain-Barré y otros) asociados a enfermedad febril por Zika (INS, 2016). Para el 2019, con 425 casos de Zika diagnosticados, la incidencia total en el país cayó a 1,1 por 100.000 habitantes, aunque en zonas como el Putumayo alcanzó los 39 por 100.000 (INS, 2019). No obstante, como ha ocurrido con otras infecciones virales transmitidas por el mismo vector, en el futuro se esperan nuevas epidemias de Zika (Pergolizzi et al., 2020).

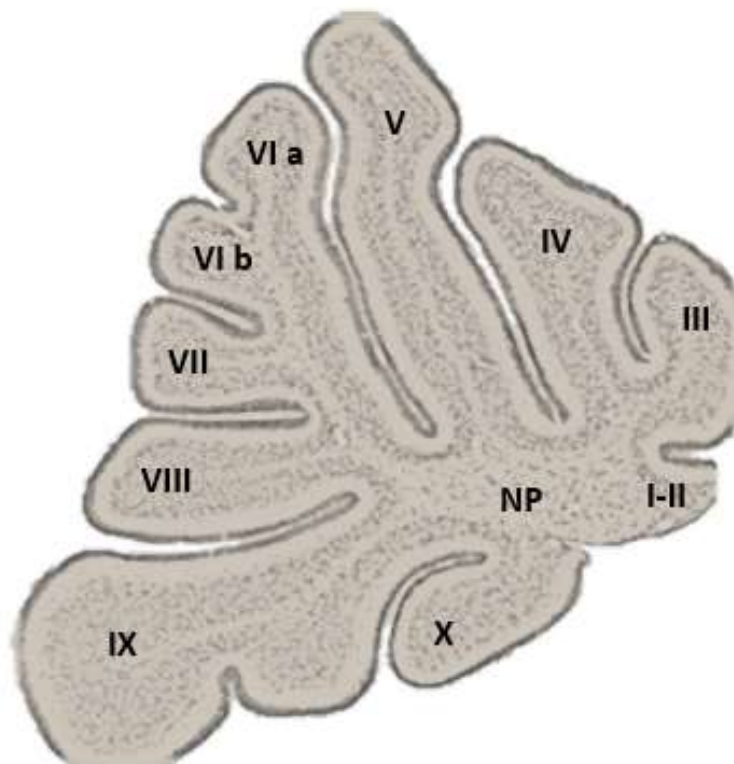
En la mayoría de los casos diagnosticados con Zika los síntomas, si se presentan, no pasan de fiebre leve y pasajera, malestar general, dolores articulares, desórdenes digestivos y conjuntivitis, entre otros, que pueden presentarse también con otras infecciones tales como el dengue y el Chikungunya (Sharma et al., 2020). En una baja proporción de adultos infectados con Zika se puede desarrollar el Síndrome de Guillain-Barré, un desorden neurológico autoinmune (el sistema nervioso es atacado por error por el sistema inmunitario) que puede ser fatal si no se trata oportunamente (Katz et al., 2019). No obstante, la consecuencia más grave del Zika es el daño irreversible que le puede causar al encéfalo en desarrollo durante la gestación, en especial la microcefalia, que ocurre cuando el virus es adquirido por la madre en los dos primeros trimestres de embarazo (Brady et al., 2019; Freitas et al., 2020). Se ha demostrado que el virus del Zika tiene especial afinidad por las células progenitoras neurales (aquellas que aún no se han diferenciado a neuronas o glía) tal como se ha podido comprobar en células humanas (Tang et al., 2016) así como

en modelos animales (Li C et al., 2016; Li H et al, 2016) y modelos in vitro (Garcez et al., 2016). Esto impide que el sistema nervioso complete su desarrollo dando como resultado un encéfalo y una cabeza con menor diámetro; esto puede ser fatal y en el mejor de los casos sobrevivir con déficit cognitivo (Liang et al., 2019; Wen et al., 2017; Sharma et al., 2020).

La microcefalia causada por el virus del Zika generalmente está asociada a otros desórdenes neurológicos y no neurológicos tales como: calcificaciones cerebrales, ventriculomegalia (dilatación de ventrículos encefálicos), atrofia en diferentes componentes del sistema nervioso, artrogriposis, defectos visuales por daño en la retina y otras estructuras del ojo, y bajo peso al nacer que en conjunto se denominan Síndrome de Zika Congénito (Freitas et al, 2021; Sharma et al., 2020). Si bien la microcefalia es la condición clínica que más se ha investigado en la enfermedad del Zika, también se ha reportado su equivalente en el cerebelo: la atrofia o hipoplasia cerebelar (Wu et al., 2018; Freitas et al., 2020). No obstante, es poco lo que se conoce sobre este último efecto neuropatológico del Zika. Adicionalmente la investigación se ha enfocado más en el estudio de las neuronas y células progenitoras. Por esta razón, en este trabajo se aborda el estudio del componente glial del cerebelo tema del cual hay escasas referencias en la literatura científica.

El cerebelo es una estructura del encéfalo a la que se le atribuyen especialmente funciones relacionadas con la coordinación motora. Eso es evidente cuando ocurren lesiones o enfermedades que lo afectan directamente. Su disfunción se manifiesta en alteraciones de la postura y el movimiento. Se localiza detrás del tallo cerebral y está formado por dos hemisferios y el vermis, una porción estrecha localizada en posición medial a los dos hemisferios. El cerebelo se compone de 10 folias o

láminas dispuestas en dirección anteroposterior como las páginas de un libro. Estas se pueden identificar fácilmente observando un corte en un plano sagital medial (ver esquema abajo). Todas confluyen en una porción de sustancia blanca central dentro de la cual están inmersos los núcleos profundos como islas de sustancia gris que se constituyen en los centros de salida de información hacia el tálamo, tallo cerebral y la médula espinal. En otras palabras, allí se localizan las neuronas de proyección que conectan al cerebelo con otras partes del SNC (Acosta et al., 2018; Delgado, 2001).



Esquema de un corte sagital del cerebelo de un ratón de 11 días de nacido indicando su composición en 10 folias que confluyen en los núcleos profundos (NP).

La composición celular de la corteza cerebelar se repite en cada una de las folias y es esencialmente la misma en todos los vertebrados. La corteza del cerebelo en un mamífero adulto está compuesta por tres capas: la molecular más externa, la

granular más interna y en el intermedio los cuerpos celulares de neuronas de Purkinje dispuestas en una sola hilera. Dentro de la capa molecular se destaca la arborización dendrítica de las células de Purkinje y dos poblaciones neuronales: las células en cesta y las células estrelladas (Delgado, 2001). El componente glial de la capa molecular son los procesos celulares de la glía de Bergmann, un tipo de astrocito morfológicamente modificado. Estos procesos se intercalan estrechamente con las dendritas de las células de Purkinje. Los cuerpos celulares de la glía de Bergmann también se encuentran muy cerca de los somas de las células de Purkinje (Yamada & Watanabe, 2002). La capa granular está constituida por las células gránulo, las neuronas más numerosas de todo el sistema nervioso (se calcula que pueden ser más del 50% de todas las neuronas de un sólo individuo). El principal componente glial en esta capa son astrocitos con morfología característica de astroglia, también llamados astrocitos parenquimales (Buffo & Rossi, 2013). Otros tipos neuronales menos abundantes en la corteza del cerebelo con las células de Golgi, las células de Lugaro y las células en cepillo (Delgado, 2001).

A diferencia de la corteza cerebral que en los mamíferos al nacer (incluyendo al humano) está compuesta por neuronas postmitóticas (diferenciadas) (Molnár et al., 2006; Stiles & Jernigan, 2010), la corteza del cerebelo de los mamíferos neonatos, incluyendo a la especie humana, posee una capa exterior llamada granular externa que está compuesta por células progenitoras. Estas migran a través de la glía de Bergmann hasta la capa granular interna. La migración termina unas semanas o meses después del nacimiento hasta que desaparece la capa granular externa hacia el día postnatal 20-21 en ratas y ratones y en los humanos antes de cumplir el primer año (García & Rodríguez, 2017; Storniollo-Squintone et al., 2012). Mientras que las neuronas de la capa granular interna tienen su origen en las células que

migran desde la capa granular externa, los demás componentes celulares de la corteza del cerebelo se originan durante el desarrollo prenatal a partir de la zona ventricular (SV) (Joyner & Sudarov, 2012; Sotelo, 2015).

Las células gliales del SNC se clasifican en astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Los oligodendrocitos tienen como función sintetizar la mielina que envuelve a los axones de las neuronas, por esta razón abundan principalmente en la sustancia blanca. La microglía, que en principio tiene como función la defensa frente al ataque de agentes extraños, está constituida por células derivadas del sistema inmunológico, por lo tanto, tienen origen mesodérmico a diferencia de los demás tipos de glía y las neuronas que derivan del ectodermo embrionario (Naftel & Fratkin, 2013). Dentro de la neuroglia se destacan los astrocitos como las células más numerosas del sistema nervioso; se calcula que están en proporción 10:1 en relación con las neuronas, y tienen diferentes funciones: servir como soporte dentro del tejido nervioso, aportar nutrientes a las neuronas, formar parte de la barrera hematoencefálica y participar en el metabolismo de los neurotransmisores, especialmente del GABA y el glutamato (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Hurtado, 2018).

El nombre astrocito se deriva de la forma estrellada que tiene la mayoría de estas células, aunque actualmente se acepta la existencia de una mayor diversidad morfológica, la glía de Bergmann es uno de estos ejemplos (Yamada & Watanabe, 2002; Farmer & Murai, 2017). Los métodos histológicos convencionales tales como la tinción con hematoxilina y eosina no permiten distinguir fácilmente entre los tipos de glía, por lo tanto, se requiere la utilización de marcadores. Estos son moléculas características de cada tipo de célula, generalmente proteínas. La proteína ácida

fibrilar de la glía (GFAP, por su sigla en inglés) y la proteína S100 β , son marcadores de astrocitos (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Tateishi et al., 2006). La GFAP forma parte del citoesqueleto de estas células y se concentra principalmente en sus procesos (ramificaciones) celulares. La S100 β es una proteína reguladora de la concentración del calcio intracelular y se encuentra difundida dentro del citoplasma. Los cambios en la expresión de GFAP y S100 β generalmente están asociados con respuestas del sistema nervioso ante la presencia de un agente infeccioso y otras alteraciones generadas por lesiones o patologías de diferente origen (traumas, tumores, etc) (Sofroniew & Vinters, 2010; Guillamón-Vivancos et al., 2015; Hurtado, 2018).

Entre los antecedentes importantes que motivaron el desarrollo de este trabajo es el hallazgo de que los astrocitos parecen ser las primeras células en infectarse una vez el virus del Zika atraviesa la barrera hematoencefálica (Van den Pol et al., 2017) y también han demostrado ser más susceptibles a la infección en condiciones in vitro en comparación con las neuronas (Jorgacevski et al., 2019). La infección de la glía por el virus del Zika se demostró desde los primeros estudios realizados con microscopía electrónica (Bell et al., 1971). Y aunque el efecto del Zika en el cerebelo se evidenció desde los primeros estudios imagenológicos realizados en fetos humanos (Brady et al., 2019), los trabajos de investigación en Zika dedicados al cerebelo son escasos y más aún si el tema de estudio es la glía. Por esta razón el propósito de este trabajo fue estudiar el efecto de la infección con virus del Zika en la inmunorreactividad de GFAP y S100 β en el cerebelo de ratones neonatos.

Materiales y Métodos

- *Inoculación y manejo de animales de laboratorio.*

Para este estudio se utilizaron como biomodelos ratones de la cepa BALB/c, de un día de nacidos, inoculados cada uno con 60 μ L de una solución con virus del Zika por vía intraperitoneal (9.4×10^{-6} PFU/ml) y ratones control inoculados con la misma solución vehículo, pero desprovista del virus (Mock). Debido al carácter lactante de los ratones estos se conservaron en camadas, generalmente de 6 o más animales, al cuidado de sus madres. Por lo tanto se utilizaron 6 animales, todos de una misma camada como controles y otros 6 animales de una misma camada que fueron inoculados con el virus. No fue necesario repetir el experimento. Este número de animales se ajusta al modelo estadístico utilizado. Este modelo de infección con virus del Zika fue establecido previamente por el Grupo de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud (INS) (Torres-Fernández et al., 2017; Laiton-Donato et al., 2019).

La inoculación con el virus y los procedimientos posteriores con los animales de experimentación se llevaron a cabo en el Bioterio del INS con nivel de bioseguridad 2 (ABSL2). Después de la inoculación los animales permanecieron durante 10 días más, en salas de alojamiento con condiciones ambientales adecuadas, dentro de cajas con diseño especial para ratones. A los 10 días postinoculación los ratones inoculados con Zika presentaron signos avanzados de la enfermedad (pérdida significativa de tamaño y peso, temblor, parálisis de sus extremidades y otros signos neurológicos). En estas condiciones los animales enfermos y sus controles se trasladaron a la sala de necropsias en donde se sacrificaron para extraer sus encéfalos. Cada uno de ellos fue inoculado inicialmente con un anestésico (hidrato

de cloral Merck), 0,05 ml de solución acuosa al 30%. Luego de 3 minutos se comprobó su pérdida total de reflejos y se procedió a realizar una incisión en el tórax hasta exponer el corazón, aun latiendo, y proceder a la fijación por perfusión intracardiaca inicialmente con tampón fosfato salino (PBS) durante 1 minuto para extraer la sangre y luego con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos hasta que todo el cuerpo del animal adquirió una consistencia rígida. A continuación, se extrajo el encéfalo y se colocó en un frasco con PFA 4% para trasladarlo al Laboratorio de Morfología Celular en donde se conservó a 4°C por pocos días hasta llevar a cabo el procedimiento inmunohistoquímico.

El protocolo de manejo de los animales de laboratorio utilizados en este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del INS (Acta No. 4 de mayo 19 de 2016) como parte del proyecto avalado y financiado por el INS (CTIN-13-2016) y Colciencias (Proyecto 210474455818, convocatoria 777 de 2017). Este es el procedimiento de manejo de animales estandarizado por el grupo para estudios similares. Puesto que aquí sólo se utilizó un hemisferio del cerebelo, el otro hemisferio y el resto del encéfalo se utilizaron para cumplir con otros objetivos del macroproyecto arriba citado.

- *Estudio inmunohistoquímico*

Se utilizó una metodología previamente estandarizada por el Grupo de Morfología Celular del INS (Ver Anexo 1). Las reacciones inmunohistoquímicas se llevaron a cabo en cortes sagitales mediales de cerebelo de 50 micrómetros de espesor obtenidos en un vibrátomo utilizando cuchillas de afeitar. A este nivel se tomó como referencia el área de los núcleos profundos para mantener un rango estrecho y seriado de los cortes, delimitando así el área de estudio para garantizar la

uniformidad del plano de cerebelo analizado al comparar las muestras de controles con las infectadas. Estos se recogieron en PBS dentro de cajas de Petri muy pequeñas (2x1cm) en donde permanecieron a temperatura ambiente (20°C), en flotación y agitación constante, a 75 revoluciones por minuto, hasta el día siguiente. Inicialmente los cortes se trataron con cloruro de amonio (NH_4Cl) 0,05M, por 30 minutos, para contrarrestar el efecto de los aldehídos utilizados para la fijación y luego con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, 20 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. A continuación, los cortes se incubaron durante 30 minutos en una solución que contenía suero normal de caballo al 3% y albúmina bovina al 3% para bloquear sitios inespecíficos. Luego, se retiró esta solución de bloqueo y, sin lavar, los cortes se incubaron durante toda la noche en las soluciones que contenían cada uno de los anticuerpos primarios. Estas se prepararon en PBS con Tritón al 0,01%. Se emplearon anticuerpos policlonales comerciales elaborados en conejo (anti-GFAP Dako ref: Z0334 en dilución 1:1000 y anti-S100 β Abcam ref: ab868 en dilución 1:500).

Al día siguiente, luego de tres lavados con PBS, los cortes se transfirieron a la solución con el anticuerpo secundario (anti-conejo Sigma-Aldrich ref: B 8895 en dilución 1:400) durante 2 horas. Inmediatamente después de los lavados los cortes se trataron con una solución preparada a partir de un Kit comercial ABC/Vector que contiene avidina-biotina y peroxidasa. Así se forma un complejo con la cadena de anticuerpos que debe ser visualizado mediante un cromógeno. El cromógeno seleccionado para revelar la inmunotinción fue la diaminobencidina (DAB) preparada en un Kit (DAB-Níquel Vector) que contiene níquel para intensificar la reacción. Finalmente se montaron los cortes en láminas portaobjeto pretratadas con gelatina y

aplicando Entellan (Merck). Con estos micropreparados se realizó la evaluación microscópica.

La especificidad de los anticuerpos empleados está garantizada pues se trata de productos comerciales de circulación mundial ya reportados por otros investigadores y por trabajos anteriores del grupo. Además, para estandarizar el protocolo de reacción de los anticuerpos primarios se utilizaron cortes los cuales se procesaron, simultáneamente, siguiendo el mismo procedimiento pero omitiendo los anticuerpos. De la misma manera se hizo con el anticuerpo secundario.

- *Morfometría*

Inicialmente se llevaron a cabo observaciones cualitativas de la inmunotinción en las micropreparaciones para describir las características histomorfológicas de la distribución de la inmunorreactividad para cada uno de los marcadores en los cortes de cerebelo de los animales utilizados como controles. Luego se hizo lo mismo con el material obtenido de los animales infectados con Zika. De acuerdo con esto se optó por medir la inmunorreactividad (grado de inmunotinción) de GFAP y S100 β en la capa molecular de la corteza del cerebelo y hacer conteos de células inmunorreactivas a S100 β en la capa granular. Las inmunorreacciones se evaluaron mediante densitometría óptica, un procedimiento que se fundamenta en medir el paso de luz a través de los cortes montados en las láminas portaobjeto (García del Moral et al., 1993). Entre mayor sea el paso de luz a través de los micropreparados que contienen los cortes histológicos menor será la cantidad de proteína medida y viceversa. De tal manera que al comparar los controles con los infectados se puede establecer si hay o no cambios en la inmunorreactividad de las proteínas.

Las mediciones densitométricas se llevaron a cabo en aumentos de 400X en un microscopio Zeiss Axiophot con ayuda del programa ImageJ. Para mantener las mismas características de cada medición se tomaron los datos de cada lámina con los controles y sin cambiar ninguna de las condiciones de iluminación se colocaron las láminas correspondientes a las muestras infectadas. Los conteos de células inmunorreactivas a S100 β se hicieron en un microscopio Zeiss utilizando una rejilla micrométrica. Se evaluaron campos de 100 micrómetros cuadrados con el objetivo 10X. En los dos casos el análisis se llevó a cabo con 6 muestras de animales controles y 6 infectados (Unidades experimentales). Se obtuvo una lámina con cortes por cada muestra y se tomaron datos de 3 cortes (repeticiones) por cada lámina (muestra).

Para el análisis estadístico se utilizó el método de Wilcoxon ideal para muestras pequeñas (de 3 a 8 según Scheffler, 1981). Esta es una prueba no paramétrica que tiene la siguiente interpretación: puesto que se van a comparar dos medias (controles e infectados) los valores superiores ($p > 0.05$) son evidencia para aceptar la hipótesis nula (H_0) o igualdad de las medias. Valores inferiores $p < 0.05$ son evidencia para aceptar la hipótesis alterna o diferencia de las medias.

Resultados

- *Histología en el cerebelo de ratones control e infectados con ZIKV.*

En los cerebelos de ratones control de 11 días de nacidos se observó un patrón de distribución uniforme en las diez folias, además de verse bien definidas las cuatro capas corticales: capa granular externa (capa característica de la etapa en desarrollo, las células de esta capa migran hacia la capa granular interna), capa molecular, capa de células de Purkinje (sólo se pueden observar con mayor aumento en el microscopio) y capa granular interna (Figura 1A). Las imágenes panorámicas de los cerebelos infectados (Figura 1B), revelaron cambios patológicos importantes: se observan alteraciones en su morfología, principalmente hipoplasia (atrofia) así como la disminución del área de los núcleos profundos y daño tisular (daño en el tejido) que incluye vacuolización (Figura 1B).

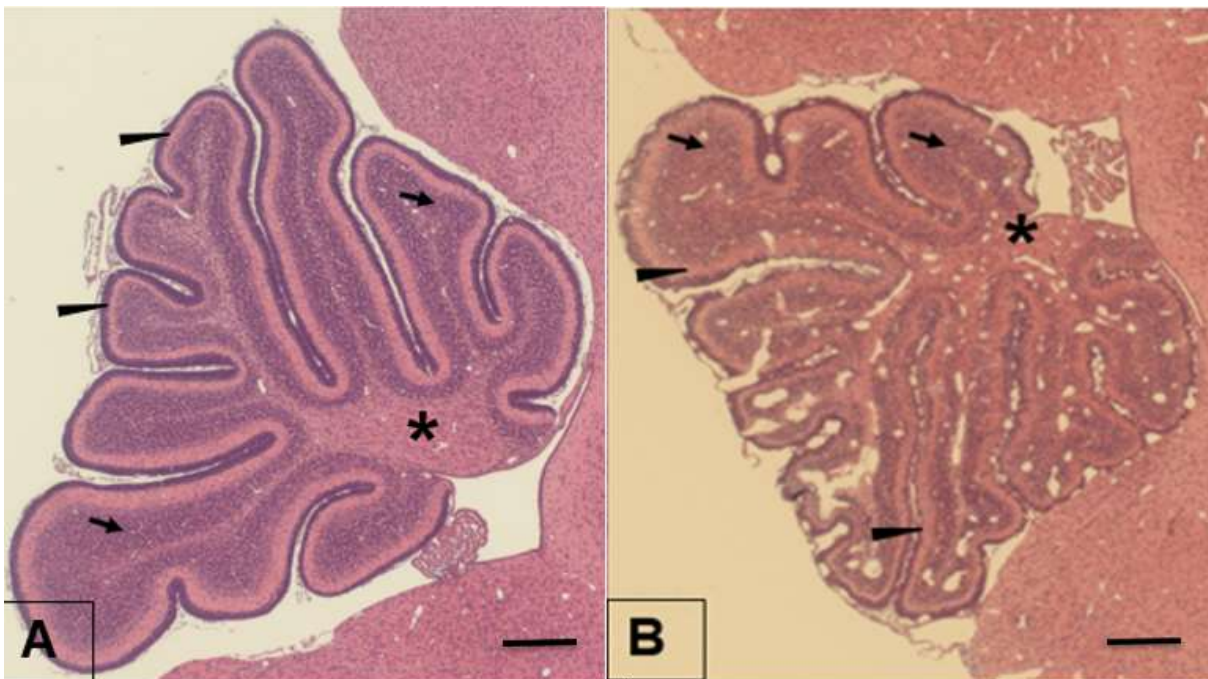


Figura 1. Coloración H&E (Hematoxilina y Eosina) en cortes sagitales de cerebelos de ratones de 11 días de nacidos. (A) Ratón control. Distribución uniforme en las diez folias del cerebelo, se observan tres capas: capa granular externa a manera de una banda oscura que bordea a las folias, capa molecular de color rosado (puntas de flecha) y capa granular interna (flechas cortas). (B) Ratón

infectado con ZIKV; es evidente el menor tamaño en las folias y en el área de los núcleos profundos (asterisco); además, daño tisular y dilatación en los vasos sanguíneos. Barra = 250 micrómetros (Fotografías tomadas de Torres-Fernández et al., 2022).

- *Inmunorreactividad a GFAP en el cerebelo de ratones control e infectados*

En el cerebelo de ratones control se observó un patrón de distribución uniforme de la proteína GFAP en todas las folias. En la imagen panorámica la inmunorreactividad a GFAP en ratones control se localizó principalmente en la capa molecular y en la sustancia blanca (Figura 2A). No se observó inmunotinción en la capa granular externa; mientras que, en la granular interna se notó una marcación punteada dispersa. Tampoco se evidenció inmunorreactividad en el área de los núcleos profundos (Figuras 2 C). La glía de Bergmann se distinguió por sus procesos celulares GFAP+ emergiendo en paralelo en dirección radial hacia la piamadre, aunque no se revelaron los cuerpos celulares que los originan (Figura 2E). En los cerebelos infectados (Figuras 2 B-D-F) se observó mayor inmunorreactividad a GFAP en comparación con los controles en las capas corticales y se destaca que en los infectados sí se observó inmunorreactividad intensa en el área de los núcleos profundos (Figura D). La mayor inmunotinción hizo visibles los cuerpos celulares de la glía de Bergmann dando origen a los procesos paralelos (Figura F).

El aumento de inmunorreactividad a GFAP en la capa molecular del cerebelo de los animales infectados con ZIKV fue evidente y estadísticamente significativo ($p=0.0043$) (Tabla 1). Este análisis se llevó a cabo mediante densitometría realizada por áreas en campos de 40X. De igual manera se pudo evidenciar el aumento significativo ($p=0.0022$) de la inmunorreactividad en la capa granular de los ratones infectados, esta vez midiendo la inmunorreactividad célula por célula (Tabla 1). No era necesario hacer medición en los núcleos profundos teniendo en cuenta la ausencia de inmunotinción en los controles.

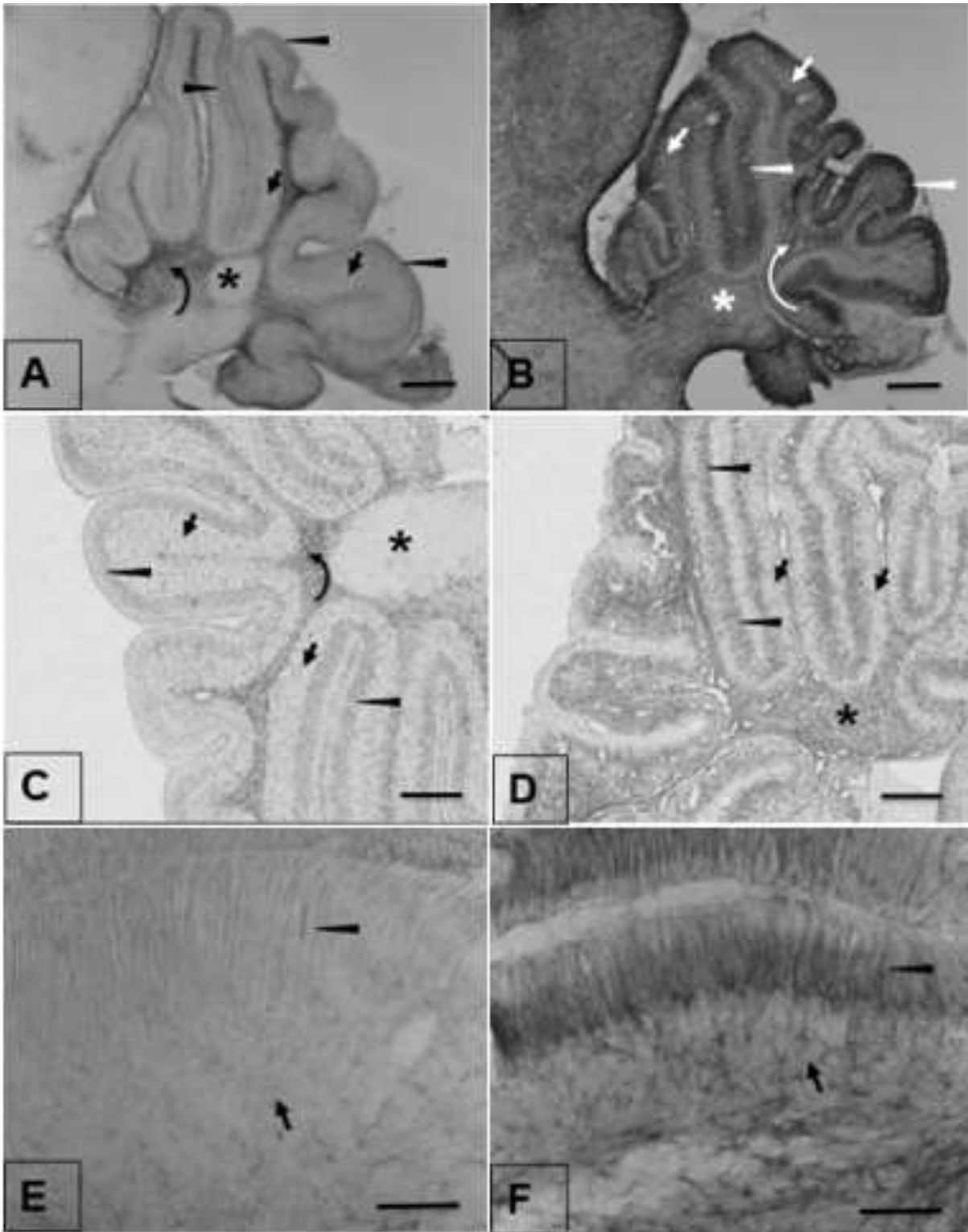


Figura 2. Inmunorreactividad de GFAP en cortes sagitales de cerebelo. **(A)** Ratón control. Se observa marcación en la capa molecular a manera de una banda continua (puntas de flecha) y más intensa en la sustancia blanca (flecha curva). En la capa granular interna (flechas cortas) la inmunotinción es menor mientras que en la zona de los núcleos profundos (asterisco) no hay inmunorreactividad. **(B)** Ratón infectado. En general se observa mayor inmunorreactividad en las capas molecular y granular interna y se nota marcación en el área de los núcleos profundos. **(C)** Plano sagital medial del cerebelo

de un ratón control en donde se destaca la falta de inmunorreactividad en los núcleos profundos. Nótese la banda de inmunotinción en la capa molecular y la marcación punteada difusa en la capa granular interna. Además, la intensa inmunorreactividad de la sustancia blanca que revela la presencia de la proteína en los astrocitos. **(D)** Ratón infectado. Es evidente la intensa inmunorreactividad a GFAP en los núcleos profundos y el aumento de la expresión tisular de la proteína principalmente en la capa molecular. **(E)** Imagen en mayor aumento de la capa molecular y la capa granular interna en un ratón control. Son evidentes los procesos paralelos alargados de la glía de Bergmann en la capa molecular. **(F)** Ratón infectado. Es notable el aumento de inmunotinción en las capas molecular y granular interna. La mayor expresión tisular de GFAP en la glía de Bergman hace visibles sus cuerpos celulares desde los cuales emergen sus procesos paralelos en dirección a la piamadre. Su tinción es más intensa en los dos tercios proximales correspondientes a la capa molecular haciendo visible la capa granular externa (un poco más clara) hasta donde también alcanzan a llegar los procesos gliales. **A-B:** Barra = 250 micrómetros. **C-D:** Barra = 100 micrómetros. **E-F:** Barra = 50 micrómetros.

Tabla 1. Densitometría de la inmunorreactividad a GFAP en las capas granular y molecular del cerebelo en ratones control e infectados con ZIKV.

Capa granular Medición en células			Capa molecular Medición en campos	
Muestras	Controles	Infectados	Controles	Infectados
1	119.503	66.144	122.518	35.355
2	103.243	69.434	87.224	39.775
3	97.859	71.673	44.016	40.871
4	89.504	69.929	105.772	38.099
5	83.689	75.547	40.251	38.803
6	90.331	81.807	43.862	34.030
Promedio	97.350±12.83	72.422±5.53	73.940±36.01	37.822±2.63
Valor P	0.0022**		0.0043**	

Valores promedio en la escala de luz transmitida (0-255). A menor valor, mayor es la inmunotinción (concentración de la proteína).

Densitometría celular: El dato por cada muestra corresponde al promedio obtenido de 3 cortes (réplicas) a partir de la medición en 10 células por cada corte en la capa granular.

Densitometría por área: El dato por cada muestra corresponde al promedio obtenido en 3 cortes (réplicas) a partir de la medición de 2 campos (400X) por corte en la capa molecular.

.
** Diferencia significativa. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

- *Inmunorreactividad a S100β en el cerebelo de ratones control e infectados.*

En los cortes sagitales de los cerebelos de los ratones control (Figuras 3 A-C-E) se observó inmunotinción de S100β principalmente en la capa molecular de la corteza, con mayor intensidad en los cuerpos celulares de la glía de Bergmann. Igualmente, en la capa granular interna se observaron abundantes células (astrocitos) inmunorreactivas a la proteína. También fue evidente la inmunorreactividad a S100β en la zona de los núcleos profundos que corresponde a glía que acompaña a estas neuronas.

En los ratones infectados la inmunorreactividad fue más intensa (Figura 3 B-D-F) en la capa molecular, debido a la reacción de la glía de Bergmann. También se reveló un aumento en la inmunotinción y en el número de células S100β+ (astrocitos) de la capa granular interna. Así mismo, se incrementó la inmunorreactividad en la zona de los núcleos profundos. El aumento de la inmunotinción de S100β en la capa molecular medida por áreas (campos en el microscopio) en los animales infectados con ZIKV fue evidente y estadísticamente significativo ($p=0.0411$). De igual manera se comprobó el aumento significativo en la densitometría por células de la capa granular interna ($p=0.0022$) (Tabla 2). Adicionalmente, mediante los conteos se demostró el aumento significativo en el número de células inmunorreactivas a S100β ($p=0.0079$) en la capa granular interna (Tabla 3) (Figura 4). El número promedio de células S100β en campos de 40X en los controles fue de 35 y de 52 en los infectados.

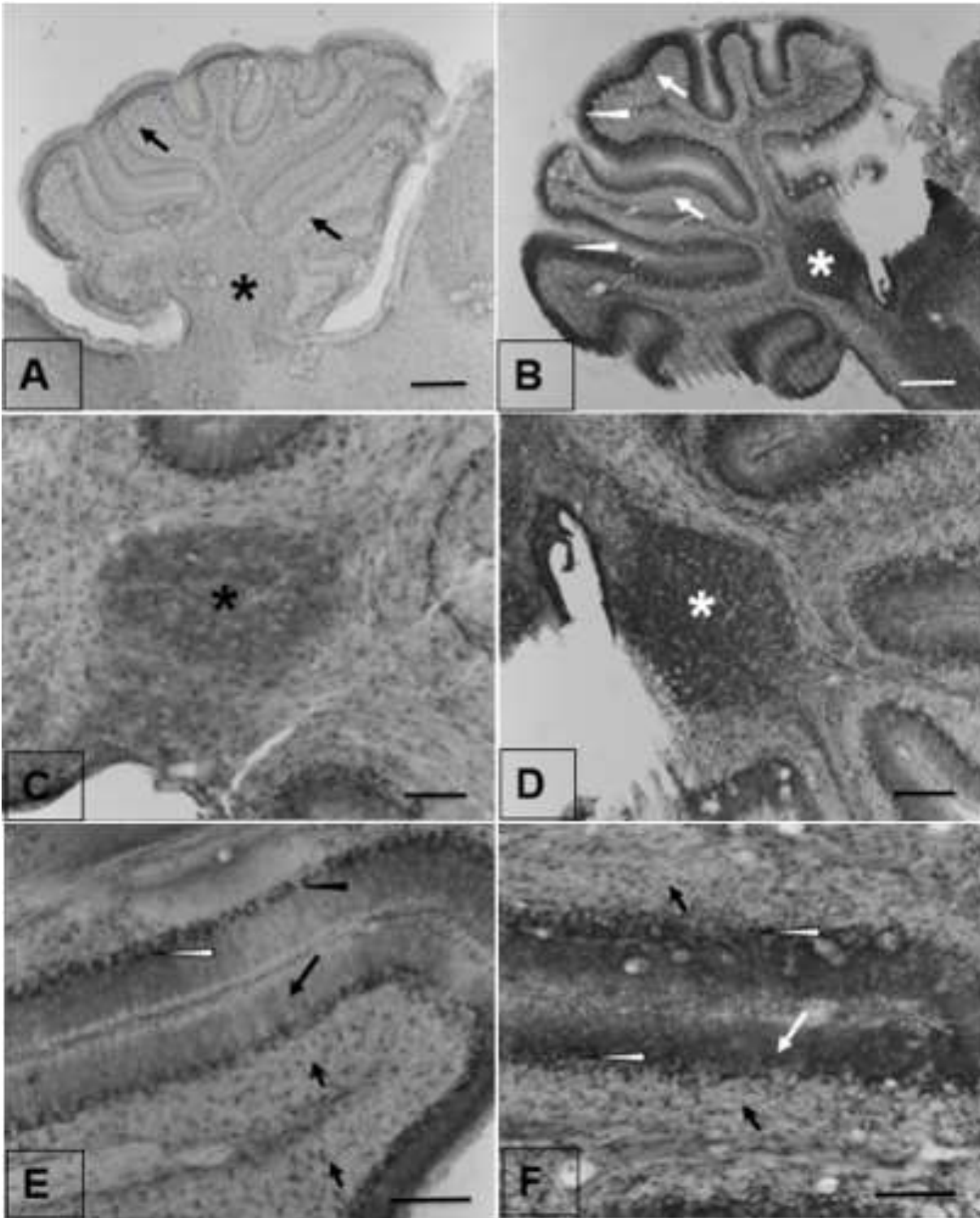


Figura 3. Inmunorreactividad a S100 β en cortes sagitales de cerebelo. **(A)** Ratón control. Se observa inmunotinción en los cuerpos celulares de la glía de Bergmann bordeando la capa molecular (puntas de flecha). En la capa granular interna (flechas cortas) se nota marcación punteada difusa lo mismo que en el área de los núcleos profundos (asterisco). **(B)** Ratón infectado. En general se observa mayor inmunorreactividad en las capas molecular y granular interna y se nota marcación intensa en el área de los núcleos profundos. **(C)** Plano sagital medial del cerebelo de un ratón control en donde se

destaca la inmunorreactividad a S100 β en la zona de los núcleos profundos. **(D)** Ratón infectado. Es evidente la mayor inmunorreactividad de la proteína en el área de los núcleos profundos. **(E)** Imagen en detalle de la capa molecular y la capa granular interna en un ratón control. Nótese la hilera de cuerpos celulares de la glía de Bergmann (puntas de flecha) cuyos procesos celulares se proyectan hacia la capa molecular (flecha larga). En la capa granular interna se aprecian cuerpos celulares positivos que corresponden a astrocitos. **(F)** Ratón infectado. Es notable el aumento de inmunotinción en la glía de Bergmann (capa molecular) mientras que se observa mayor densidad de astrocitos positivos en la capa granular interna. **A-B:** Barra = 250 micrómetros. **C-D:** Barra = 100 micrómetros. **E-F:** Barra = 50 micrómetros.

Tabla 2. Densitometría de la inmunorreactividad a S100 β en las capas granular y molecular del cerebelo en ratones control e infectados con ZIKV:

<i>Muestras</i>	<i>Capa granular interna</i> Medición en células		<i>Capa molecular</i> Medición en campos	
	<i>Controles</i>	<i>Infectados</i>	<i>Controles</i>	<i>Infectados</i>
1	105.335	68.930	87.133	78.031
2	113.226	78.848	96.037	87.443
3	103.272	78.568	90.920	84.744
4	108.010	74.667	91.339	83.003
5	115.795	81.578	98.687	90.132
6	86.092	80.903	83.498	82.200
Promedio	105.288\pm9.60	77.249\pm4.73	91.269\pm5.57	84.259\pm4.23
Valor P	0.0022**		0.0411**	

Valores promedio en la escala de luz transmitida (0-255). A menor valor, mayor es la inmunotinción (concentración de la proteína).

Densitometría celular: El dato por cada muestra corresponde al promedio obtenido de 3 cortes (réplicas) a partir de la medición en 10 células por cada corte en la capa granular.

Densitometría por área: El dato por cada muestra corresponde al promedio obtenido en 3 cortes (réplicas) a partir de la medición de 2 campos (400X) por corte en la capa molecular.

** Diferencia significativa. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.

Tabla 3. Distribución del número de células positivas para S100 β en la capa granular interna de cerebelos infectados con Zika y sus respectivos controles.

Muestras	Controles	Infectados
1	40	79
2	36	56
3	33	46
4	33	43
5	35	42
Promedio	35	52
Valor P	0.0079**	

Los datos corresponden al promedio de cuatro conteos por muestra en campos de 400X.

** Diferencia significativa. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

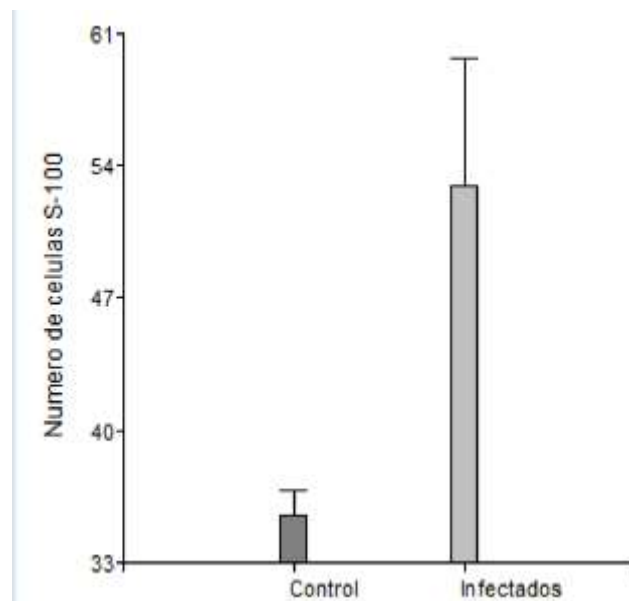


Figura 4. Diagrama obtenido a partir de los conteos de células inmunorreactivas a S100 β en la capa granular interna del cerebelo. Se halló diferencia estadísticamente significativa soportada con un valor p de 0.0079 al comparar controles con infectados.

Discusión

- *Histología en el cerebelo de ratones control e infectados con ZIKV.*

Las láminas obtenidas mediante la técnica histológica convencional que incluye la coloración con hematoxilina y eosina (H&E) revelaron en los controles, la imagen característica del cerebelo en desarrollo en plano sagital; esto es, la corteza plegada para formar 10 folias y la zona correspondiente a los núcleos profundos. La imagen a primera vista es semejante a la del cerebelo de un ratón adulto con excepción de la presencia de la capa granular externa. Por lo tanto, en ratones lactantes se confirmó lo que ya se conoce del cerebelo en general para diferentes mamíferos en fase postnatal, incluyendo al humano (García & Rodríguez, 2017; Storniolo-Squintone et al., 2012). La infección con el ZIKV generó hipoplasia y daño tisular que incluyó también dilatación de los vasos sanguíneos. Efectos similares debidos a la infección con ZIKV se han reportado en otros estudios con ratones (Cugola et al, 2016; Winkler et al., 2022) y en fetos humanos estudiados mediante imágenes diagnósticas (Wu et al., 2018; Freitas et al., 2020; Sequerra et al., 2020). No obstante, la coloración H&E no permite identificar tipos de glía como para evaluar lo que la infección pueda generar en estas poblaciones celulares.

- *Inmunorreactividad a GFAP en el cerebelo de ratones control e infectados.*

La inmunotinción de GFAP en los cortes sagitales de cerebelo de ratones control también reveló características similares a las observadas en ratones adultos de acuerdo con otro trabajo realizado por el grupo de investigación en donde se desarrolló el presente estudio (Hurtado et al., 2021). Básicamente la inmunorreactividad a GFAP en el cerebelo de los ratones de 11 días se localizó en los procesos celulares de la glía de Bergmann y de los astrocitos en la capa granular

interna. En condiciones normales no es una buena tinción para los cuerpos celulares de estas células puesto que los gliofilamentos que dan origen a la inmunotinción se localizan principalmente en los procesos celulares y no en el citoplasma de los astrocitos (Sofroniew & Vinters, 2010; Guillamón-Vivancos et al., 2015). Por el contrario, en las muestras de los ratones infectados con ZIKV, la mayor inmunorreactividad a GFAP de los astrocitos en respuesta a la infección, que revela un exceso en la síntesis de la proteína, hizo visibles los cuerpos celulares de la glía de Bergmann y de algunos astrocitos de la capa granular interna. La sobreexpresión de GFAP, forma parte de la reacción astrogliar y es la respuesta que generalmente ocurre en condiciones patológicas (Guillamón-Vivancos et al., 2015) y, en particular, con infecciones virales (Sofroniew & Vinters, 2010; Hurtado, 2018; Hurtado et al., 2017, 2018). Previamente el grupo había reportado reacción astrogliar en el cerebelo de ratones adultos jóvenes (4-5 semanas) (Hurtado et al., 2021). Igualmente se había reportado gliosis (aumento exagerado en el número de astrocitos) en el cerebro (corteza y estructuras subcorticales) de ratones neonatos inoculados con ZIKV (Rivera et al., 2020). En un estudio publicado recientemente (Winkler et al., 2022) realizado con ratones transgénicos de 7 días, inmunosuprimidos para la acción del interferón e infectados con ZIKV, se describe inmunorreacción a GFAP en la corteza cerebral y en el cerebelo. En esta estructura la reacción glial se encontró en la sustancia blanca, los núcleos profundos y en la capa granular interna pero no en la capa molecular (glía de Bergmann). Esto contrasta con nuestros resultados en donde sí se evidenció reacción en la glía de Bergmann.

- *Inmunorreactividad a S100β en el cerebelo de ratones control e infectados.*

La proteína *S100β* forma parte del grupo de la familia EF-Hand, proteínas caracterizadas por tener entre sus funciones la captura del exceso de calcio en las células (Donato et al, 2013). Si bien no es exclusiva de astrocitos sí se considera uno de sus marcadores (Tateishi et al, 2006; Sofroniew & Vinters, 2010). A diferencia de la GFAP, la *S100β* se distribuye uniformemente dentro del citoplasma de tal manera que facilita el reconocimiento individual de las células mediante inmunohistoquímica. Además, es un mejor marcador que la GFAP en condiciones normales (Hurtado, 2018). Así, por ejemplo, en los cerebelos de los controles la inmunotinción a *S100β* reveló con claridad la morfología de los cuerpos celulares de la glía de Bergmann y de los astrocitos en la capa granular interna. Esto permitió hacer conteos en esta última. Por otra parte, en el área de los núcleos profundos de los controles sí se presentó inmunorreactividad a *S100β* a diferencia de la GFAP. En los infectados se acentuó la inmunotinción a *S100β* tanto en los cuerpos celulares como en los procesos paralelos de la glía de Bergmann dando lugar una marcación intensa en la capa molecular. Igualmente se incrementó notoriamente la expresión de la proteína en la zona de los núcleos profundos en donde, además de la inmunotinción de los astrocitos, también es evidente la inmunorreactividad en el neuropilo (tejido difuso alrededor de las células formado principalmente por los procesos celulares de glía y neuronas) tanto en los controles como en los infectados, en estos últimos con mayor intensidad. En general esta respuesta de la *S100β* a la infección con el ZIKV es similar a la reportada anteriormente en ratones adultos infectados con el virus de la rabia (Hurtado et al, 2017, 2018). Tratándose de una proteína reguladora del calcio intracelular la mayor expresión de *S100β* en el cerebelo de los animales infectados probablemente es una respuesta al ingreso de

calcio en exceso provocado por la infección (Hurtado, 2018). No obstante, el aumento en su expresión puede alcanzar niveles neurotóxicos y por lo tanto ser perjudicial para el tejido nervioso (Michetti et al, 2019).

- *Comentario final*

Se desconoce cuál es el papel de la reacción astrogliar en las infecciones virales pues mientras algunos estudios han hallado efectos benéficos como el de capturar el exceso de sustancias que pueden ser citotóxicas (ej: glutamato, calcio) en otros casos los experimentos han arrojado como resultado el desencadenamiento de reacciones conducentes a la neurodegeneración (Bender et al, 2012). Aun así, con este trabajo se contribuye al conocimiento básico de la neuropatogénesis del Zika, en especial la del cerebelo. La información publicada sobre este tema está relacionada principalmente con estudios en imágenes diagnósticas y hallazgos histológicos que revelan atrofia o hipoplasia en fetos humanos y en ratones. Sin embargo, en una revisión detallada realizada en la base de datos Pubmed no se encontró ninguna referencia de la glía de Bergmann en estudios del ZIKV. Tampoco se encontró información relacionada con la proteína *S100B* en la patogénesis del Zika; y los resultados del único estudio de la GFAP en cerebelo afectado por Zika publicado recientemente (Winkler et al., 2022) difieren en algunos aspectos con nuestro trabajo. Por lo tanto, aquí se presentan algunos datos de la patología del Zika que pueden considerarse inéditos para el conocimiento de la patogénesis de esta infección viral. Adicionalmente, estos resultados confirman la utilidad de este modelo animal, inmunocompetente, obtenido por el grupo de Morfología Celular del INS (Torres-Fernández et al., 2017, 2021; Laiton-Donato et al., 2019) para hacer investigación del efecto del ZIKV en el sistema nervioso. Y teniendo en cuenta que el

cerebelo es la única estructura que conserva una proporción significativa de células progenitoras al nacer, y la susceptibilidad de este tipo de células a la infección con ZIKV (Li C et al., 2016), este modelo puede dar origen a una línea de investigación importante para generar conocimiento de la fisiopatología del Zika relacionada con las funciones del cerebelo en su papel como regulador de la función motora. Avances de los resultados de este trabajo se presentaron previamente en un evento científico (Pérez et al., 2020)

- *Conclusiones*

1- La infección con el ZIKV en ratones neonatos generó atrofia parcial (hipoplasia) en el desarrollo postnatal del cerebelo.

2- Se demostró el aumento en la inmunorreactividad de los marcadores de astrocitos GFAP y S100B en diferentes áreas y células de ratones inoculados con ZIKV.

3- Sí bien sólo la GFAP se considera un marcador exclusivo de astrocitos, es de gran utilidad complementar los estudios de la astrogía analizando también la S100B.

4- Con los resultados de este trabajo se está contribuyendo a generar conocimiento básico de la patogénesis causada por el virus del Zika en el sistema nervioso, en particular, en el cerebelo que ha sido mucho menos estudiado que el cerebro.

REFERENCIAS

- Acosta LM, Nieto K, González A, Ovalle L, Mora J, Tramontini C. Anatomía del cerebelo en imágenes de resonancia magnética cerebral con correlación funcional. *Revista Médica Sanitas* 2018; 21(3): 135-140.
- Bell, TM., Field, EJ & Narang, HK. Zika Virus Infection of the Central Nervous System of Mice. *Archiv für die Gesamte Virusforschung* 1971;35(2): 183-193.
- Bender C, Frik J, Gómez R. Role of astrocytes in viral infections. En: *Astrocytes*. González-Pérez O. Editor. Nova Science Publishers, Inc. 2012; 109-124.
- Brady OJ, Osgood-Zimmerman A, Kassebaum NJ, Ray SE, de Araújo VEM, da Nóbrega AA, et al. The association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil 2015-2017: An observational analysis of over 4 million births. *Observational study*. *PLoS Medicine* 2019;16 (3): doi: 10.1371/journal.pmed.1002755.
- Buffo A, Rossi F. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Progress in Neurobiology*. 2013;109: 42-63. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.08.001.
- Carod-Artal, F. Epidemiología y complicaciones neurológicas de la infección por el virus Zika: un nuevo virus neurotrófico emergente. *Revista de Neurología* 2016; 62(7): 317-328.
- Cugola F, Fernandes I, Russo F, Freitas B, Dias J, Guimarães K, Benazzato C, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016; 534(7606):267-271.
- Delgado JM. Estructura y función del cerebelo. *Revista de Neurología*. 2001; 33(7):635-642.
- Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Current Molecular Medicine*. 2013;13(1):24-57.
- Farmer WT, Murai K. Resolving astrocyte heterogeneity in the CNS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017; 11:300. doi: 10.3389/fncel.2017.00300.
- Freitas D, Souza-Santos R, Carvalho L, Barros W, Neves L, Brasil P, Wakimoto M. Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLoS ONE*. 2020; 15(12): e0242367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>
- García del Moral R, O'Valle F, Masseroli M. Técnicas de análisis de imágenes en morfología microscópica. En: García del Moral R, editor. *Laboratorio de Anatomía Patológica*. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 1993. p. 405-425.
- García E, Rodríguez A. Estudio histológico del desarrollo del cerebelo. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2017; 11;181-186. <http://dx.doi.org/10.5209/RCCV.55496>
- Garcez P, Loiola E, Costa R, Higa L, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016; 352 (6287): 816-818.

- Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, & Matías-Guiu J. Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*. 2015; 30(2), 119–129.
- Hurtado, A. Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural del efecto de la infección con virus de la rabia sobre los astrocitos de la corteza cerebral en ratones. Tesis de Maestría en Neurociencias. Universidad Nacional de Colombia - Instituto Nacional de Salud. 2018. Bogotá, Colombia.
- Hurtado A, Santamaría G, Torres-Fernández O. Efecto diferencial de la infección con virus de la rabia en la expresión de tres marcadores de astrocitos en corteza cerebral de ratón. *Biomédica* 2017; 37(Supl.3), 129-130.
- Hurtado A, Santamaría G, Sarmiento L, Torres-Fernández O. Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of astrocytes in the cerebral cortex of mice inoculated with rabies virus. *Memorias Congreso Nacional de Ciencias Biológicas* 2018 (1): 210-211. (ISSN 2665-265X).
- Hurtado A, Murcia X, Naizaque J, Torres-Fernández O. Expresión tisular de las proteínas GFAP y S 100 β en cerebelo de ratones infectados y no infectados con virus de la rabia. *Memorias XII Congreso Nacional XIII Seminario Internacional de Neurociencias* 2021: 121. (ISSN 2805-7147).
- Instituto Nacional de Salud. 2016. Boletín Epidemiológico Semanal No. 52, diciembre 25-31. Consultado enero 26/21: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/>.pdf
- Instituto Nacional de Salud. 2019. Boletín Epidemiológico Semanal No. 52, diciembre 22-28. Consultado enero 26/21: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_52.pdf
- Jorgacevski J, Korva M, Potokar M, Lisjak M, Avšič-Županc T, Zorec R. ZIKV Strains Differentially Affect Survival of Human Fetal Astrocytes versus Neurons and Traffic of ZIKV-Laden Endocytotic Compartments. *Scientific Reports*. 2019; 9(1):8069. doi: 10.1038/s41598-019-44559-8.
- Joyner AL, Sudarov A. Genetic neuroanatomy. En: Watson C, Paxinos G, Puelles L (Eds.). *The mouse nervous system*. 2012. Academic Press: London, pp. 36-50.
- Katz I, Gilburd B, Shovman O. Zika autoimmunity and Guillain-Barre syndrome. 2019. *Current Opinion of Rheumatology*. 31(5):484-487.
- Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*. 2016; 94 (9):675–686.
- Laiton-Donato K, Álvarez-Díaz DA, Rengifo AC, Torres-Fernández O, Usme-Ciro JA, Rivera J, Santamaria G, et al. Complete genome sequence of a Colombian Zika virus strain obtained from BALB/c mouse brain after intraperitoneal inoculation. *Microbiology Resource Announcements*. 2019;8(46). PII: E01719-18. doi:10.1128/MRA.01719-18.

- Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin C, XU Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*. 2016; 19(5): 120–126.
- Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N, Tang W., et al. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. *Cell Stem Cell*. 2016; 19(5):593-598.
- Liang B, Guida J, Nascimento M, Mysorekar I. Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome. *Virulence*. 2019; 10 (1): 768–775.
- Metsky H, Matranga C, Wohl S, Schaffner S, Freije C, Winnicki S, West K, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017; 546(7658): 411–415.
- Michetti F, Ambrosi N, Toesca A, Puglisi M, Serrano A, Marchese E, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *Journal of Neurochemistry*. 2019; 148(2):168-187.
- Molnár Z, Métin C, Stoykova A, Tarabykin V, Price D, Francis F, et al. Comparative aspects of cerebral cortical development. *European Journal of Neuroscience*. 2006; 23(4): 921-934
- Naftel JP & Fratkin JD. Biología celular de las neuronas y la glía. En: Haines DE (Ed.) *Principios de Neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas*. Elsevier: Barcelona. 2013. p. 14-31.
- Pérez LM, Santamaría G, Rivera J, Beltrán J, Rengifo AC, Lozano YY, Torres-Fernández O. Efecto de la infección con virus del Zika en la expresión de los marcadores de células gliales GFAP y S100β en el cerebelo de ratones neonatos. *Memorias Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Versión 55-Virtual*. 2020 (3): 236-238. (ISSN 2665-265X).
- Pergolizzi J Jr, LeQuang JA, Umeda-Raffa S, Fleischer C, Pergolizzi J III, Pergolizzi C, Raffa RB. The Zika virus: Lurking behind the COVID-19 pandemic? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2020; 00:1-10. <http://doi:10.1111/jcpt.13310>
- Rivera J, Rengifo A, Sarmiento L, Santamaría G, Álvarez D, Naizaque J, Corchuelo S, Torres-Fernández O. Demostración de astrocitosis reactiva en un modelo murino de infección con el virus Zika. *Infectio*. 2020; 24(3): 56.
- Scheffler WC. *Bioestadística*. Fondo Educativo Interamericano. México; 1981. p. 218-221.
- Sequerra E, Rocha A, Medeiros G, Neto M, Maia C, Arrais N, et al. Association between brain morphology and electrophysiological features in Congenital Zika Virus Syndrome: A cross-sectional, observational study. *EClinicalMedicine*. 2020; 26:100508 doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100508. PMID: 33089122

- Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Canadian Journal of Microbiology*. 2020; 66(2): 87–98.
- Sofroniew M, Vinters H. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119(1): 7-35.
- Sotelo C. Molecular layer interneurons of the cerebellum: Developmental and morphological aspects. *Cerebellum*. 2015;14(5):534-556.
- Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychology Review*. 2010; 20(4):327–348.
- Storniolo-Squintone A, Guerini J, Fonseca I, Samar M, Spitale L. Estudio morfológico comparativo de la corteza cerebelosa humana en dos grupos etarios. *International Journal of Morphology*. 2012; 30(3):825-828.
- Tang H, Hammack C, Ogden S, Peng K, Song H, Ming G. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*. 2016; 18: 587–590.
- Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shinagawa R, Kagamiishi Y. S100B: astrocyte specific protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2006; 26 (1): 11-16.
- Torres-Fernández O, Rengifo AC, Álvarez D, Corchuelo S, Santamaría G, Monroy-Gómez J et al. Obtención de un modelo animal para el estudio de la infección por el virus del Zika. *Biomédica*. 2017;37 (Supl. 3): 54-55.
- Torres-Fernández O, Rengifo AC, Santamaría G, Rivera J, Corchuelo S, Naizaque J, Muñoz A. El Ratón BALB/C: Un modelo animal para la investigación neurobiológica del ZIKA. *Innovación y Ciencia* 2021;29(2): <https://innovacionciencia.com/revista/110>
- Van den Pol A, Mao G, Yang Y, Ornaghi S, Davis JN. Zika Virus Targeting in the Developing Brain. *Journal of Neuroscience*. 2017;37(8): 2161-2175.
- Wen Z, Song H, Ming G. How does Zika virus cause microcephaly?. *Genes & Development*. 2017; 31(9):849–861.
- Winkler C, Clancy C, Rosenke R, Peterson K. Zika virus vertical transmission in interferon receptor 1- antagonized Rag1 mice result in postnatal brain abnormalities and clinical disease. *Acta Neuropathologica Communications*. 2022; 10(1): 46.
- Wu S, Zeng Y, Lerner A, Bao B, Law M. Nervous System Injury and Neuroimaging of Zika Virus Infection. *Frontiers in Neurology*. 2018; 9:227. doi: 10.3389/fneur.2018.00227.
- Yamada K, Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anatomical Science International*. 2002; 77(2): 94–108.

ANEXO 1

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA GFAP Y S100B

DIA 1

1. Se realizaron cortes en vibrátomo de 50 μm . Se incubaron en PBS durante toda la noche (aproximadamente 20 horas) en agitación constante (horizontal) a 75 revoluciones /min.

DIA 2

1. Lavados en PBS (**3X10 minutos**)
2. Tratamiento con NH_4Cl 0.05M(0.03gr en 10 ml de PBS) por **30 minutos**.
3. Lavado en PBS (**10', 5', 5'**)
4. Tratamiento con H_2O_2 al 30% en PBS durante **30 minutos**.
5. Lavado en PBS (**10', 5', 5'**)
6. Bloqueo: composición de la solución

PBS	5ml
Suero normal de caballo	150 μL
BSA (albumina bovina)	150 mg
Tritón 10%	50 μL

7. Incubación en anticuerpo primario (**20h aprox.**): Anti-GFAP en dilución 1:1000, Anti-S100 β en dilución 1:500

DIA 3

1. Lavados en PBS (**3X10'**)
2. Incubación en anticuerpo secundario anti-conejo dilución 1:400 (**2 horas**)
3. Lavados en PBS (**3X10'**)
4. Solución ABC (se prepara 30 minutos antes de la aplicación) (**2 horas**)
5. Lavados en PBS (**3X5'**)
6. Revelado con Kit DAB-Niquel
7. Montar en lámina pretratada con gelatina