

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de la degradación post mórtem sobre la detección inmunohistoquímica de antígenos en el cerebro de ratón

Effect of postmortem degradation on the immunohistochemical detection of antigens in the mouse brain

Jeison Alexander Monroy-Gómez¹, Orlando Torres-Fernández^{2*}

¹ Biólogo. Joven Investigador. Grupo de Morfología Celular-INS. Instituto Nacional de Salud (INS).

² Biólogo. Magíster en Morfología. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Profesional especializado. Grupo de Morfología Celular-INS. Instituto Nacional de Salud (INS).

* Correo electrónico: otorresf@ins.gov.co

Fecha de recepción: 12 – 12 - 13

Fecha de aceptación: 22 - 03 – 14

Citar este artículo así:

Monroy-Gómez JA, Torres-Fernández O. Efecto de la degradación post mórtem sobre la detección inmunohistoquímica de antígenos en el cerebro de ratón. Revista Investig. Salud Univ. Boyacá. 2014; 1(1): 45 - 62

RESUMEN

Introducción. Si bien lo ideal es llevar a cabo la preservación de los tejidos en el menor tiempo posible luego de la muerte de un animal objeto de un estudio neurohistoquímico, con frecuencia es inevitable trabajar con tejido nervioso obtenido varias horas post mórtem.

Objetivo. Estudiar el efecto de la degradación post mórtem sobre la inmunorreacción de diferentes antígenos en el cerebro de ratón.

Métodos. Se inocularon ratones con virus de la rabia y se extrajeron los cerebros luego de fijar los animales con paraformaldehído mediante perfusión. En otro grupo de animales la extracción de los encéfalos se hizo para fijarlos por inmersión con el mismo fijador y en diferentes horas post mórtem. En un vibrátomo se obtuvieron cortes coronales de los cerebros, y estos se procesaron para inmunodetección de rabia y de otros cuatro antígenos.

Resultados. Cuatro de los antígenos evaluados, calbindina, parvalbúmina, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA), presentaron pérdida de inmunorreacción cuando el tejido cerebral se había tratado previamente mediante fijación por inmersión. Este efecto fue más acentuado cuando aumentó el tiempo post mórtem antes de la fijación. Por el contrario, la inmunorreacción al virus de la rabia se incrementó cuando transcurrieron más de seis horas post mórtem antes de la fijación.

Conclusiones. La fijación por perfusión es ideal para estudios de inmunohistoquímica de diferentes antígenos. La degradación tisular post mórtem generalmente provoca disminución de la inmunorreacción. No obstante, los antígenos del virus de la rabia incrementan su inmunorreacción a medida

que transcurre el tiempo post mórtem antes de la fijación.

Palabras clave: cambios post mórtem, inmunohistoquímica, virus de la rabia, neurotransmisores, proteínas de enlace del calcio. (Fuente: DeCS)

ABSTRACT

Introduction: It is advisable to carry out the preservation of tissues in the shortest time after the death of an animal subject of neurochemical study but it is often unavoidable to work with nervous tissue obtained several hours postmortem.

Objective: To study the effect of postmortem degradation on immunoreactivity of different antigens in the mouse brain.

Methods: Mice were inoculated with rabies virus and the brains were removed after the animals were fixed by perfusion with paraformaldehyde. In another group of animals the brain extraction was performed and they were fixed by immersion in the same fixative solution at different hours postmortem. Coronal sections of the brains were obtained in a vibratome and they were processed for immunodetection of rabies, and other four antigens.

Results: Four of the antigens studied, calbindin, parvalbumin, glutamate and GABA, showed loss of immunoreactivity when brain

tissue was pretreated by immersion fixation. This effect was more noticeable when postmortem time increase before the fixing. Conversely immunoreactivity to rabies virus was increased over six hours postmortem before fixation.

Conclusions: Fixation by perfusion is ideal for immunohistochemical studies of different antigens. Postmortem tissue degradation usually causes decreased immunoreactivity. However, rabies virus antigens show increased immunoreactivity when elapses more postmortem time before fixation.

Keywords: Postmortem changes, immunohistochemistry, rabies virus, neurotransmitter agents, calcium binding proteins. (Source: DeCs)

INTRODUCCIÓN

La introducción de procedimientos basados en las reacciones inmunológicas, ha representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés en biología animal y vegetal difíciles de medir mediante los métodos bioquímicos habituales (1). El uso de anticuerpos para la detección de antígenos específicos de agentes patógenos, proteínas o neurotransmisores, entre otras moléculas, está ampliamente reconocido a nivel mundial en pruebas de diagnóstico e investigación (2). Ejemplo de ello es la producción de anticuerpos contra las proteínas

de enlace de calcio que regulan la concentración del calcio intracelular en las neuronas. Estos anticuerpos han sido una herramienta importante en estudios histológicos, inmunohistoquímicos e histopatológicos del sistema nervioso, ya que se expresan diferencialmente en determinadas subpoblaciones neuronales (3-6).

De igual forma, la inmunohistoquímica es útil para estudiar la expresión de neurotransmisores específicos en las neuronas, con anticuerpos capaces de detectar pequeñísimas diferencias entre moléculas (7). Esta técnica se ha empleado en el estudio del ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glutamato, los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso, con el fin de entender los procesos normales y patológicos que afectan la función de estas dos moléculas, ya que el deterioro de su equilibrio puede alterar la función neurológica (8). La inmunohistoquímica también se ha empleado en la detección de antígenos de virus que afectan al sistema nervioso, como el de la rabia, el de Epstein-Barr, el virus herpes y el virus linfotrópico humano-T de tipo I (HTLV-I), entre otros (9-11).

Sin embargo, uno de los problemas más frecuentes en la aplicación de esta técnica es la preservación de los antígenos (12). Existen diferentes métodos para conservar la capacidad de reacción de los anticuerpos en tejidos y evitar la destrucción celular. El más

conocido es la fijación mediante sustancias que tienen la capacidad de endurecer los tejidos, preservando en su gran mayoría las condiciones estructurales y citoquímicas de los mismos. Pero el uso de diferentes soluciones de fijación puede causar un impacto en las propiedades de los tejidos, especialmente para la detección inmunohistoquímica (13). Por esta razón, es necesario optimizar los protocolos de fijación. Cuando se trabaja con animales de experimentación el método de fijación mediante perfusión es el más indicado, puesto que preserva mejor las características citomorfológicas y neuroquímicas de las poblaciones neuronales (12).

Infortunadamente, esto no es posible cuando se trata de tejido nervioso extraído de necropsias practicadas después de varias horas de la muerte de un paciente (14-16). Los procesos de destrucción celular post mórtem desencadenan daños estructurales, cambios en el pH, edema cerebral, alteraciones en epítomos estructurales, en la expresión de proteínas y en la integridad química de componentes de la matriz (12, 15-17). Esto representa un problema para la preservación de antígenos (16). Investigar los cambios post mórtem se ha convertido en una cuestión importante para la anatomía comparada y la patología (16,18), especialmente para el diagnóstico de enfermedades que se basan en la histología de muestras cerebrales (19).

Por otra parte, los autores del presente trabajo tienen como principal línea de investigación el estudio de la vulnerabilidad selectiva neuronal de la infección con el virus de la rabia. Se ha demostrado el efecto de la infección sobre la expresión de proteínas (6,20), los neurotransmisores (21,22) y la estructura neuronal (23). Estos resultados se han obtenido en un modelo animal en el cual se evita la descomposición post mórtem mediante la fijación del tejido por perfusión intracardiaca con aldehído. Por lo tanto, es de gran utilidad establecer si el tejido infectado sometido a descomposición post mórtem puede exhibir resultados similares y determinar el tiempo máximo promedio antes de la fijación con aldehídos para que la capacidad antigénica del virus de la rabia sea preservada.

Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la degradación post mórtem sobre la detección inmunohistoquímica del virus de la rabia, de dos proteínas de enlace de calcio, calbindina y parvoalbúmina, y los neurotransmisores GABA y glutamato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de animales e inoculación del virus de la rabia

El estudio se llevó a cabo en ratones ICR (hembras de cuatro semanas), confinados en una sala de alta seguridad del bioterio del Instituto Nacional de Salud, en condiciones

ambientales y nutricionales adecuadas, de acuerdo con normas éticas nacionales e internacionales exigidas para la investigación con animales de laboratorio y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto.

Para la infección con el virus de la rabia se utilizaron alícuotas de virus de tipo "calle" (de origen canino), suministradas por el Laboratorio de Virología del Instituto. Para aumentar la cantidad disponible de virus, se inocularon ratones lactantes por vía intracerebral a los cuales se les extrajo el encéfalo para macerarlo y obtener las alícuotas para el trabajo experimental (6).

Para cumplir con los objetivos se utilizaron tres grupos de animales. El primero correspondió a animales infectados con el virus que se inocularon por vía intracerebral, cada uno con 0,03 ml de dilución viral (1×10^{-6}). En el segundo grupo (control) los animales se inocularon con solución diluyente desprovista del virus. La inyección se hizo a través del hueso parietal con una aguja muy fina (N° 27), para minimizar el daño del tejido cerebral. Los animales se mantuvieron en observación durante los días siguientes y se tomó nota de los cambios clínicos y de conducta hasta las 120 horas después de la inoculación. El tercer grupo de animales no recibió ningún tratamiento de inoculación. Al finalizar este tiempo, se llevó a cabo el sacrificio de los ratones como se describe a continuación.

Preparación del tejido nervioso

Animales inoculados para estudio de antígenos del virus de la rabia.

Los animales inoculados con el virus y sus controles, se sacrificaron cuando los primeros manifestaron síntomas de la enfermedad (120 horas después de la inoculación). Dos de los animales infectados y dos controles se anestesiaron con 0,2 ml de hidrato de cloral al 30 % suministrado por vía intraperitoneal (350 mg/kg). Con los animales anestesiados, se llevó a cabo la fijación por perfusión intracardiaca. Inicialmente se dejó correr solución tampón salina de fosfatos (PBS) con un pH de 7,3, durante tres minutos (aproximadamente, 30 ml) y, después, solución de paraformaldehído al 4 % como fijador, durante 10 minutos (aproximadamente, 100 ml). Después de completar la perfusión con el fijador, nuevamente se dejó circular PBS por un minuto. Una vez terminada la perfusión se extrajo el cerebro de cada ratón y se preservó en paraformaldehído al 4 %.

Los animales restantes fueron sacrificados en una cámara de CO₂ y decapitados; después se extrajeron sus cerebros en diferentes horas post mórtem (0, 6, 12, 18 y 24 horas). En cada uno de estos tiempos se tomaron los cerebros de dos animales infectados y sus respectivos controles, e inmediatamente se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4 %.

Animales no inoculados para inmunohistoquímica de proteínas y neurotransmisores

Para el estudio del efecto post mórtem sobre la inmunorreacción de proteínas (calciocalbindina y parvoalbúmina) y neurotransmisores (GABA y glutamato) en los animales no inoculados (grupo 3), se utilizaron el mismo procedimiento y tiempos de fijación que con los animales inoculados. La única diferencia fue la adición de glutaraldehído al 0,5 % combinado con paraformaldehído al 4 % para llevar a cabo la fijación. La adición de glutaraldehído a la solución de fijación es necesaria para llevar a cabo la técnica inmunohistoquímica para GABA y glutamato (21,22).

Inmunohistoquímica

Los cerebros fijados se montaron en un vibrátomo y se hicieron series de cortes coronales de 50 μm de espesor. Estos se recogieron en cajas de Petri pequeñas (2,5 cm. de diámetro) que contenían PBS. En estos recipientes se llevó a cabo todo el procedimiento inmunohistoquímico.

Los cortes se mantuvieron en flotación y agitación constante, a temperatura ambiente (20 °C). Inicialmente, fueron pretratados con cloruro de amonio (NH_4Cl_2) 0,05M por 30 minutos, para retirar los residuos de aldehídos, y después, con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3 %, para bloquear la peroxidasa endógena. Para bloquear sitios de inmunorreacción inespecífica, se utilizó una solución

compuesta por suero normal de caballo, tritón y albumina sérica bovina. Para la detección de los antígenos de interés, los cortes se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-GABA (dilución de 1:2.500) y anti-glutamato (1:2.500) policlonales (Sigma); anti-calbindina (1:2.500) y anti-parvoalbúmina (1:5.000) monoclonales (Sigma) y antisuero antirrábico (1:800) elaborado anteriormente por el grupo (Lamprea, *et al.*, 2010). Posteriormente, los cortes se incubaron en anticuerpo secundario: anti-conejo (para rabia, GABA y glutamato) y en anti-ratón (para calbindina y parvoalbúmina). A continuación se trataron con el complejo ABC (vector). Para revelar la inmunotinción de los antígenos, se utilizó diaminobencidina. Los detalles de estos procedimientos se han descrito previamente (20-22,24,25).

RESULTADOS

Apariencia general post mórtem del tejido

El tejido cerebral fijado por perfusión adquirió una consistencia dura y fue fácil retirar los encéfalos del cráneo. Los cerebros no fijados por perfusión ofrecieron mayor dificultad para ser extraídos del cráneo, debido a la consistencia blanda del tejido. Esta dificultad fue cada vez mayor a medida que aumentó el tiempo post mórtem, hasta hacerse casi deleznable. La pérdida de consistencia del material post mórtem también hizo más difícil la obtención de cortes en el vibrátomo. Estos presentaron tendencia a fragmentarse, aun

después de haberlos sumergido por varios días en la solución de fijación. En el microscopio los efectos autolíticos se observaron desde las seis horas post mórtem; se acentuó la cantidad de vasos del tejido, acompañada de alteraciones en la morfología neuronal y degradación del citoplasma de las células. Sin embargo, estos cambios histológicos no se observaron uniformemente en todo el tejido cerebral.

Inmunohistoquímica para rabia

La presencia de antígenos virales se evidenció en todas las muestras independientemente del tiempo post mórtem transcurrido.

Los efectos autolíticos afectaron la estructura del tejido cerebral pero no la detección inmunohistoquímica del virus. En el tejido infectado fijado por perfusión y en el fijado por inmersión a las 0 horas post mórtem se observaron inclusiones virales citoplasmáticas dispersas pero escasa inmunotinción del citoplasma. No obstante, a medida que aumentó el tiempo de degradación post mórtem la inmunotinción del pericarion de las neuronas se hizo más intensa hasta llegar a delimitar el contorno del soma y la base de algunas dendritas, pero, a la vez, los cuerpos de Negri se hicieron menos visibles (figura 1).

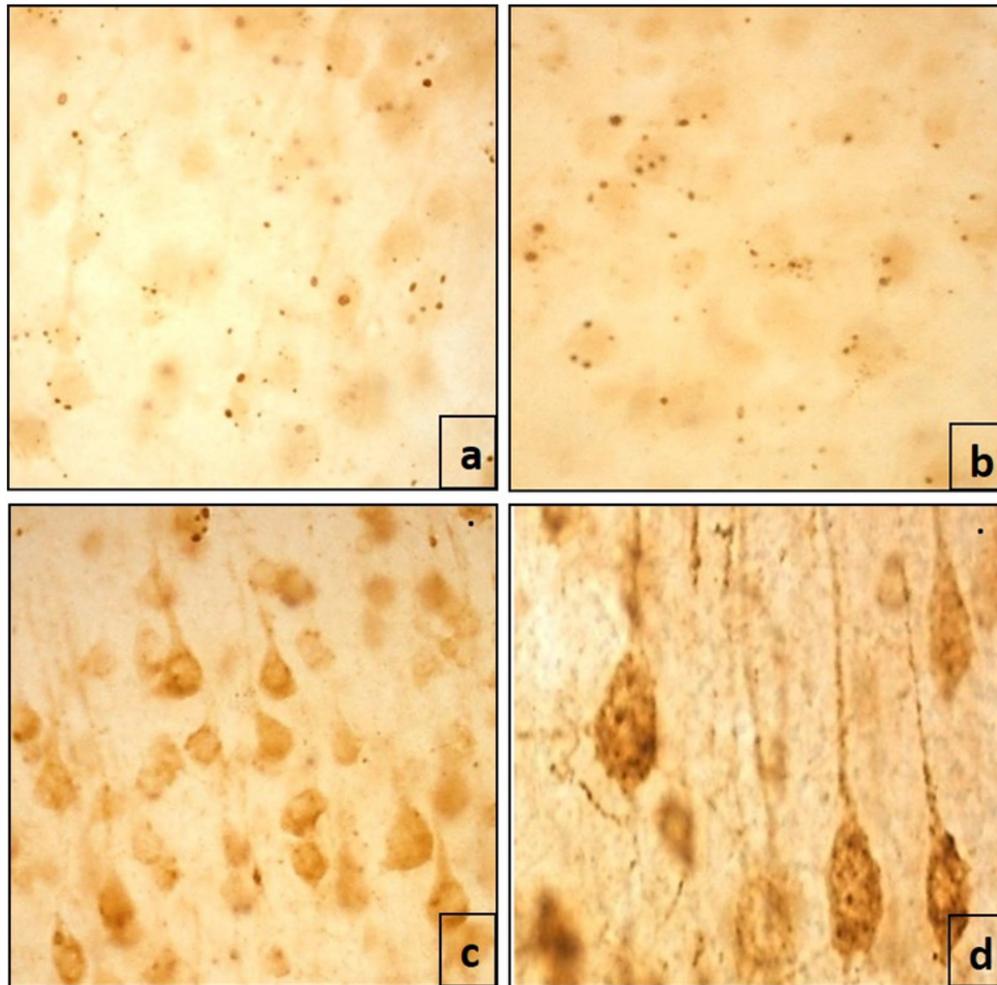


Figura 1. Inmunohistoquímica para rabia en neuronas de la corteza cerebral de ratón. La inmunorreacción se incrementa a medida que aumentan las horas post mórtem, hasta llegar a delimitar a cada neurona.

a: Fijación por perfusión (0 horas post mórtem); sólo se observan cuerpos de Negri como puntos dispersos y no se demarcan cuerpos celulares (10X). **b:** Fijación por inmersión (0 horas post mórtem); el aspecto es similar al de la imagen **a** (10X). **c:** Fijación por inmersión (12 horas post mórtem); los antígenos virales ocupan todo el pericarion neuronal hasta demarcar la morfología celular y no se observan los cuerpos de Negri (40x). **d:** Fijación por inmersión (24 horas post mórtem); los antígenos virales dentro del pericarion incrementan su inmunorreacción (100X).

Inmunohistoquímica para calbindina y parvoalbúmina

Fueron evidentes las diferencias en la inmunorreacción entre las muestras fijadas por perfusión y las muestras fijadas por in-

mersión. La fijación por perfusión permitió observar una marcación más intensa en las células positivas para calbindina y parvoalbúmina, con clara delimitación del contorno de los perfiles neuronales. En el material fijado por inmersión la inmunorreacción para calbindina disminuyó notoriamente, aun con el tratamiento iniciado a las cero horas, y la pérdida fue más acentuada en el material fijado después de varias horas post mórtem hasta desaparecer antes de las 24 horas (figura 2, cuadro 1). La detección inmunohistoquímica de células positivas para parvoalbúmina fue evidente hasta las 24 horas post mórtem. Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo de degradación se observó una disminución en el número de células marcadas y en la intensidad de la marcación (figura 3, cuadro 1).

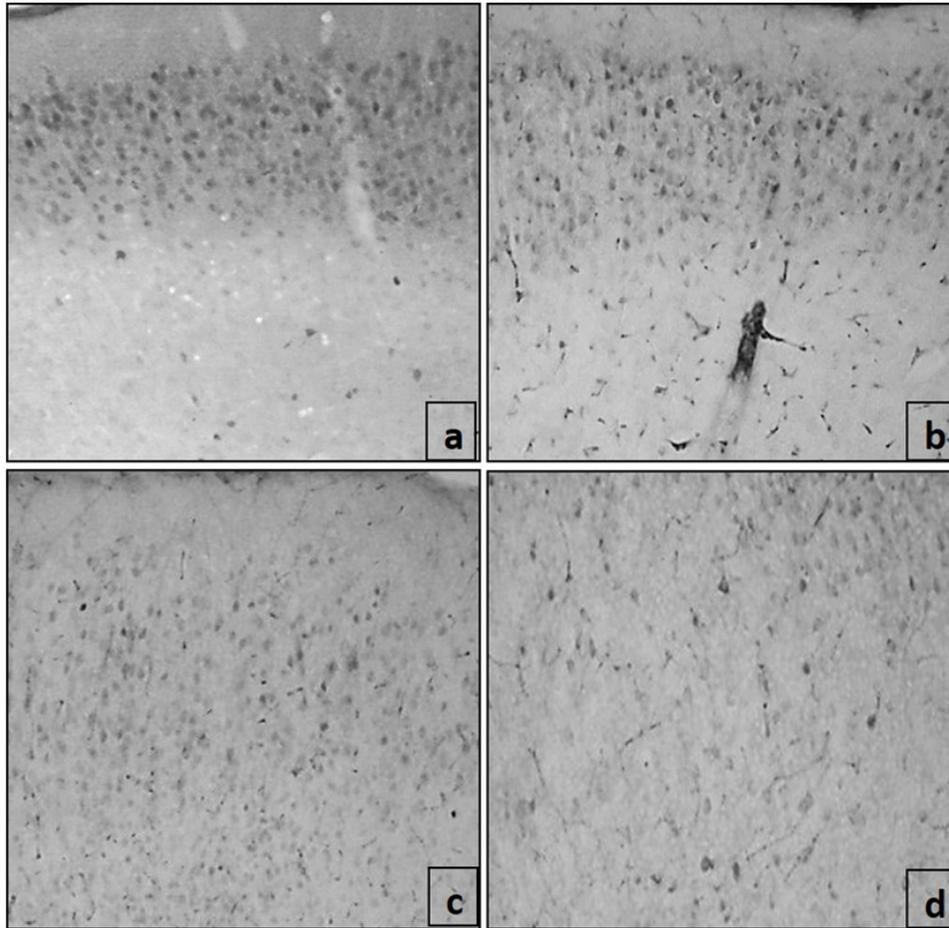


Figura 2. Inmunohistoquímica para calbindina en la corteza cerebral de ratón.

a: Fijación por perfusión (0 horas post mórtem); las neuronas positivas para calbindina se observan agrupadas densamente en las capas corticales II y III (10X). **b:** Fijación por inmersión (0 horas post mórtem); es evidente la pérdida parcial de inmunorreacción

en las capas II y III (10X). **c:** Fijación por inmersión (12 horas post mórtem); la pérdida de inmunotinción es muy acentuada (10X). **d:** Fijación por inmersión (24 horas post mórtem); la pérdida de inmunorreacción a calbindina es casi total (10X).

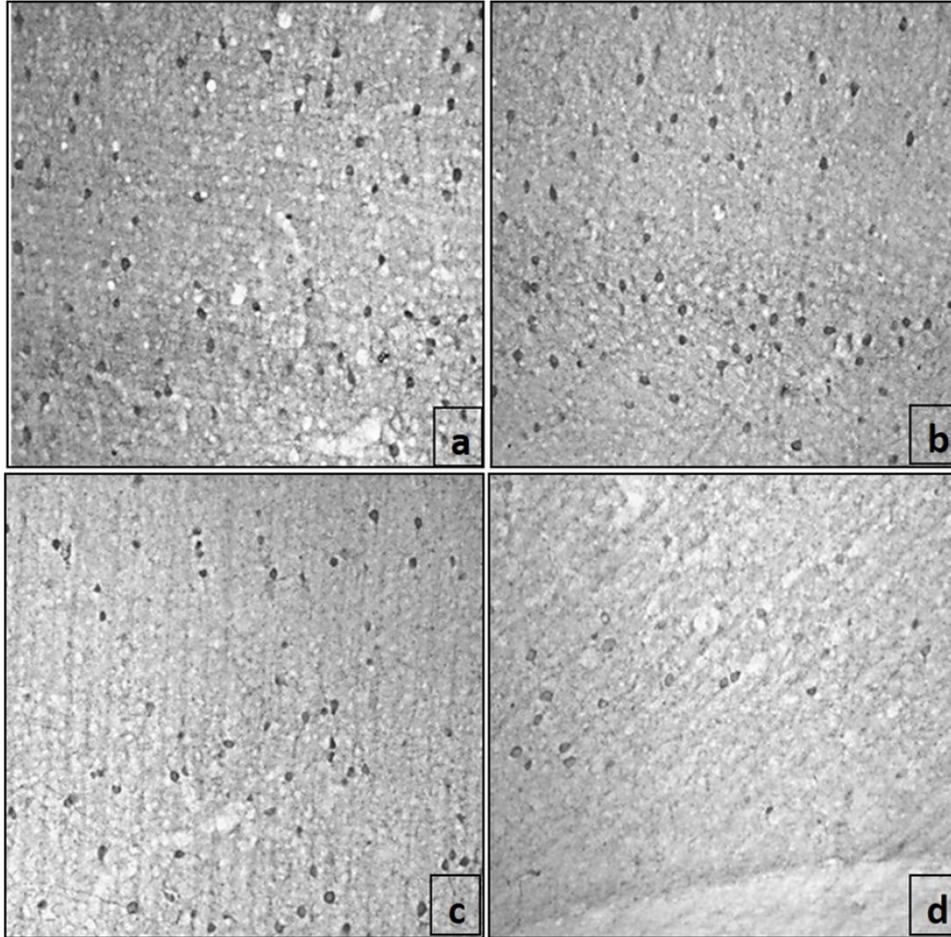


Figura 3. Inmunohistoquímica para parvalbúmina en la corteza cerebral de ratón.

Las neuronas positivas para parvalbúmina se observan dispersas dentro del tejido nervioso. **a:** Fijación por perfusión (0 horas post mórtem); la marcación de los cuerpos celulares es intensa (10X). **b:** Fijación por inmersión (0 horas post mórtem); el aspecto es similar

al de la imagen **a** (10x). **c:** Fijación por inmersión (12 horas post mórtem); es evidente la pérdida de inmunotinción en la mayoría de neuronas y en el neuropilo circundante (10X). **d:** Fijación por inmersión (24 horas post mórtem); se observan apenas algunas

neuronas débilmente marcadas y menor inmunorreacción en el neuropilo (10X).

Inmunohistoquímica para GABA y glutamato

La inmunohistoquímica para GABA y glutamato en el tejido fijado por perfusión, mostró cuerpos neuronales intensamente marcados. Pero esta inmunorreacción perdió

intensidad en el tejido fijado por inmersión y se desvaneció rápidamente en el material fijado después de varias horas post mórtem (figuras 4,5 y cuadro 1). Sin embargo, en los cortes de material fijado por inmersión procesados para GABA, aparecieron abundantes perfiles celulares que mostraban una tinción inespecífica difusa (figura 4).

Cuadro 1. Estimación cualitativa de la pérdida de inmunorreacción por efecto de la degradación post mórtem de dos proteínas y dos neurotransmisores en la corteza cerebral de ratones.

	Fijación por perfusión	Horas post mórtem (fijación por inmersión)					
		0	6	12	18	24	30
CB	+++	+++	+++	+	-	-	-
PV	+++	+++	+++	++	+	-	-
GABA	+++	+	+	-	-	-	-
Glutamato	+++	++	+	-	-	-	-

CB: calciocalbindina; PV: parvoalbúmina

Inmunotinción: +++ fuerte; ++ intermedia; + débil

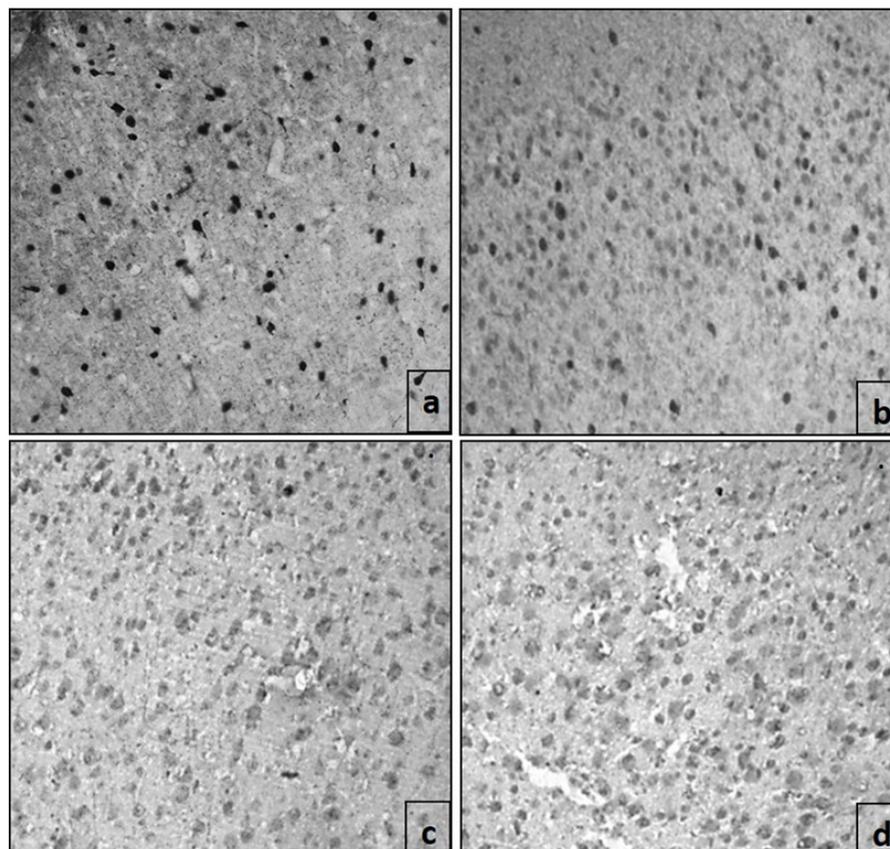


Figura 4. Inmunohistoquímica para GABA en la corteza cerebral de ratón.

a: Fijación por perfusión (0 horas post mórtem); las neuronas positivas para GABA se observan intensamente marcadas y dispersas dentro del tejido nervioso (10X). **b:** Fijación por inmersión (0 horas post mórtem); algunas neuronas positivas para GABA conservan su intensidad de marcación pero se observan muchas células con tinción ines-

pecífica (10X). **c:** Fijación por inmersión (12 horas post mórtem); ha desaparecido la marcación específica para GABA y se observan sólo células con tinción inespecífica (10X). **d:** Fijación por inmersión (24 horas post mórtem); el aspecto es similar al de la imagen c (10X).

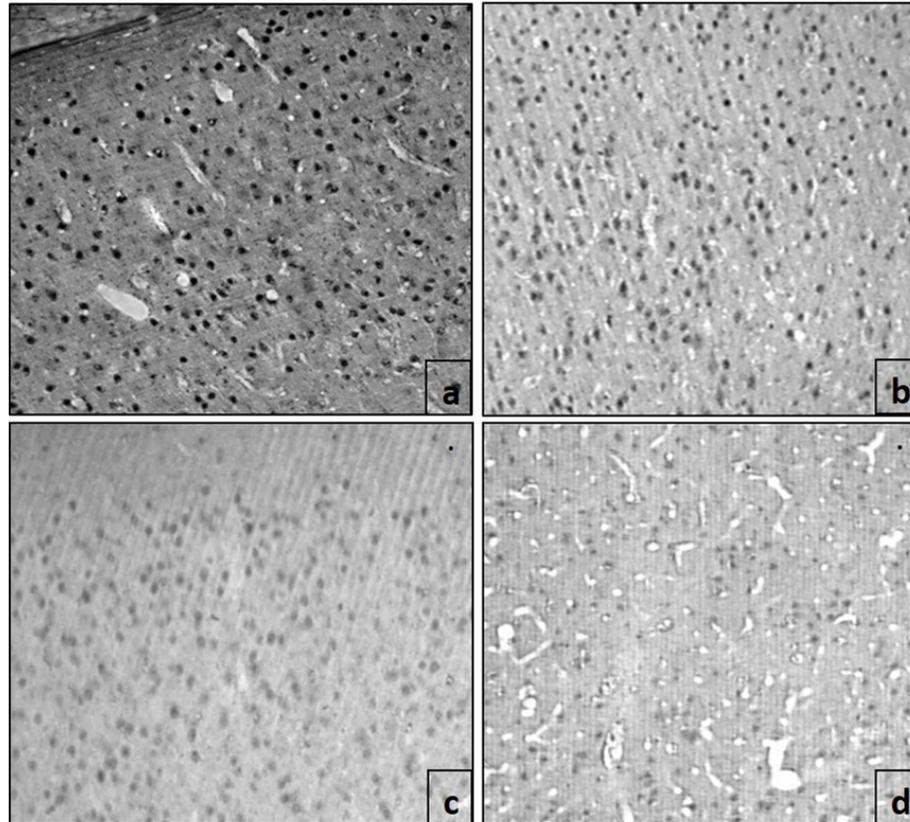


Figura 5. Inmunohistoquímica para glutamato en la corteza cerebral de ratón.

a: Fijación por perfusión (0 horas post mórtem); la marcación de los cuerpos celulares y el neuropilo es intensa (10X). **b:** Fijación por inmersión (0 horas post mórtem); se mantiene la marcación intensa de los cuerpos celulares pero el neuropilo se observa más claro (10X). **c:** Fijación por inmersión (12 horas post mórtem); es notable la pérdida de

inmunorreacción de las células y del neuropilo (10X). **d:** Fijación por inmersión (24 horas post mórtem); la pérdida de inmunotinción es más acentuada que en **c** (10X).

DISCUSIÓN

Con estos resultados se demuestra la importancia del método de fijación por perfusión

para la preservación de la inmunorreacción de antígenos presentes en el tejido nervioso en estudios experimentales. La autólisis tisular debida a la degradación post mórtem y sus efectos sobre la inmunodetección de diferentes tipos de moléculas, se han documentado previamente. No obstante, es importante determinar para cada antígeno estudiado su capacidad de preservación post mórtem en el tejido nervioso, no solamente para el diagnóstico de enfermedades sino para, eventualmente, poder llevar a cabo trabajos de investigación cuando no es posible trabajar con tejidos fijados por perfusión, como es el caso de las muestras de origen humano o de animales silvestres (12,16).

Con este trabajo se comprobó la variabilidad en la preservación post mórtem de antígenos de diferente origen. Mientras que la inmunorreacción de la proteína parvoalbúmina se preservó casi inalterada hasta las 12 horas post mórtem, la inmunorreacción de calbindina y de los dos aminoácidos neurotransmisores GABA y glutamato sí se afectó, inclusive a las 0 horas post mórtem, en el material fijado por inmersión. En general, la tendencia con estos marcadores neuronales fue la de disminuir su inmunorreacción cuando se utilizó la fijación por inmersión y, más aún, cuando aumentó el tiempo post mórtem antes de la fijación. Parte de estos resultados coinciden con otro estudio en monos (*Macaca mulatta*) en el que se comparó

tejido fijado por perfusión y tejido fijado por inmersión para evaluar la inmunorreacción de diferentes antígenos, incluidos calbindina y parvoalbúmina (12). Vale la pena destacar que estos dos marcadores parecen resistir tiempos post mórtem más prolongados en tejido cerebral humano, en donde pueden manifestar inmunorreacción en tiempos que oscilan entre las 12 y las 24 horas (26-28).

No obstante, quizá el hallazgo más importante del presente trabajo es la demostración del incremento en la inmunorreacción de los antígenos de la rabia, a medida que aumentó el tiempo post mórtem, hasta el punto de mejorar la demarcación de la morfología de las neuronas infectadas. Simultáneamente, a medida que aumentó el tiempo post mórtem disminuyó la cantidad de cuerpos de Negri. Por lo tanto, una posible explicación del aumento de la inmunorreacción de los antígenos de la rabia a través del pericarion neuronal, sería la desintegración de los cuerpos de Negri que conduciría a la diseminación de los antígenos. Es un hecho conocido que, si bien los cuerpos de Negri son el rasgo patognomónico de la rabia, su búsqueda no es un método confiable para el diagnóstico (29,30). Esto reafirma la utilidad de la inmunohistoquímica como método de diagnóstico de la rabia.

Un efecto similar de la degradación post mórtem se encontró en cerebros de ratón en los cuales se utilizó la técnica inmunohisto-

química para la proteína ácida glial fibrilar (GFAP). En ese estudio, la inmunorreacción de la GFAP se incrementó notablemente a partir de las 6 horas post mórtem y los autores lo explican como una posible desintegración de los filamentos de la proteína de la glía y la dispersión de sus epítomos antígenicos en el citoplasma (16).

AGRADECIMIENTOS

Al departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación, Colciencias y al Instituto Nacional de Salud. La participación del primer autor se realizó en el marco del programa Jóvenes Investigadores e Innovadores (Convocatoria N° 525 del 2011, convenio Instituto Nacional de Salud-Colciencias N° 0237 del 2012). Los autores, además, manifiestan su agradecimiento al biólogo Gerardo Santamaría por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Jorge D, Lara C, Ortiz C. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología*. 2007;45:126-40.
2. Meléndez M, Dujarric M, Castellano O, Posada A, Ponce de León O, González A. Evaluación de la inmunohistoquímica para el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2004;23:133-8.
3. Baimbridge K, Celio M, Rogers J. Calcium-binding protein in the nervous system. *Trends Neurosci*. 1992;15:303-8.
4. Ulfing N. Calcium-binding proteins in the human developing brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2002;165:1-92.
5. Anelli R, Heckman C. The calcium binding proteins calbindin, parvalbumin, and calretinin have specific patterns of expression in the gray matter of cat spinal cord. *J Neurocytol*. 2005;34:369-85.
6. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE, Pimienta HJ. Efecto de la infección por el virus de la rabia sobre la expresión de parvalbúmina, calbindina y calretinina en la corteza cerebral de ratones. *Biomédica*. 2004;24:63-78.
7. Buijs M, Basualdo M. Anticuerpos dirigidos a pequeñas moléculas de neurotransmisores y péptidos: producción y aplicación de anticuerpos a dopamina, serotonina, GABA, vasopresina, péptido vasoactivo intestinal, neuropéptido y,

- somatostatina y sustancia P. *Rev Esp Cienc Quim Biol.* 2009;12:38-44.
8. De Felipe J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res.* 2002;136:216-38.
 9. Eyzaguirre E, Haque AK. Application of immunohistochemistry to infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:424-31.
 10. Calore E, Pérez N, Martins J, Cárdenas P. Inmunohistoquímica en un caso de encefalitis por virus de Epstein Barr. *Rev Chil Infectol.* 2012;29:687-8.
 11. Cartier L, Vergara C, Valenzuela M. Inmunohistoquímica de los cambios degenerativos del sistema nervioso central en paraparesias espásticas asociadas al virus linfotrópico humano T tipo I (HTLV-I). *Rev Med Chile.* 2007;135:1139-46.
 12. Lavenex P, Banta P, Bennett J, Amaral D. Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: The hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 2009;512:27-51.
 13. Lavenex P. Neuroanatomy methods in humans and animals. In: Squire, LR, editor. *New encyclopedia of neuroscience.* Elsevier; Amsterdam: 2008. p. 68-78.
 14. Trimarchi C, Smith J. Diagnostic evaluation. En: Jackson A, Wunner H. editores. *Rabies.* San Diego: Academic Press: 2002. p.307-49.
 15. Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Zilles K. Postoperative investigations in epilepsy surgery: Enzymes of the oxidative stress cascade, multi-drug transporters and transmitter receptors. *Klin Neurophysiol.* 2002;33:168-77.
 16. Hilbig H, Bidmon HJ, Oppermann O, Remmerbach T. Influence of post-mortem delay and storage temperature on the immunohistochemical detection of antigens in the CNS of mice. *Exp Toxicol Pathol.* 2004;56:159-71.
 17. Oka T, Tagawa K, Ito H, Okazawa H. Dynamic changes of the phosphoproteome in postmortem mouse brains. *PLoS ONE.* 2011;6:e21405. doi:10.1371/journal.pone.0021405.
 18. Andressen C, Blümcke I, Celio MR. Calcium-binding proteins: Selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* 1993;271:181-208.
 19. Matakas F, Cervos-Navarro J, Schneider A. Experimental brain death 1. Morphology and fine structure of the brain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1973;36:497-508.
 20. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE, Pimienta HJ. Calbindin distribution in cortical and subcortical brain structures of normal and

- rabies-infected mice. *Int J Neurosci.* 2005;115:1375-82.
21. Rengifo AC, Torres-Fernández O. Disminución del número de neuronas que expresan GABA en la corteza cerebral de ratones infectados con rabia. *Biomédica.* 2007;27:548-58.
 22. Santamaría G, Rengifo AC, Torres-Fernández O. Expresión de glutamato en la corteza cerebral de ratones normales y ratones infectados con el virus de la rabia. *Revista Científica Unincca.* 2010;15:67-81.
 23. Torres-Fernández O, Yepes G, Gómez J. Alteraciones de la morfología dendrítica neuronal de la corteza cerebral de ratones infectados con el virus de la rabia: un estudio con la técnica de Golgi. *Biomédica.* 2007;27:605-13.
 24. Lamprea N, Torres-Fernández O. Evaluación inmunohistoquímica de la expresión de calbindina en el cerebro de ratones en diferentes tiempos después de la inoculación con el virus de la rabia. *Colom Med.* 2008;39:7-13.
 25. Monroy-Gómez J, Torres-Fernández O. Distribución de calbindina y parvalbúmina y efecto del virus de la rabia sobre su expresión en la médula espinal de ratones. *Biomédica.* 2013;33: 564-73
 26. Leuba G, Kraftsik R, Saini K. Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Exp Neurol.*1998;152:278-91.
 27. Masliah E, Ge N, Achim C, Hansen L, Wiley A. Selective neuronal vulnerability in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992;51:585-93.
 28. Masliah E, Ge N, Achim C, Wiley A. Differential vulnerability of calbindin-immunoreactive neurons in HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995;54:350-57.
 29. Sarmiento L, Rodríguez G, De Serna C, Boshell J, Orozco L. Detection of rabies virus antigens in tissue: Immunoenzymatic method. *Patología.*1999;37:7-10.
 30. Narayan S, Vasanth J, Karavattu V, Sukumaran M. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. *Int J Infect Dis.* 2004;8:339-45.