



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN N° 048/2023

GENERAL PICO, 02 de Marzo de 2023.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por las/los integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, respecto del Proyecto de Investigación: *“Mapeo neuroquímico del cerebro de murciélago urbano y del armadillo peludo gigante: posible herramienta para comprender la patogénesis de la rabia silvestre”* y,

CONSIDERANDO:

Que el Proyecto de Investigación enunciado en el visto estará bajo la dirección del Dr. José Luis FERRÁN BERTONE y la co-dirección de la Dra. Mónica Alejandra BOERIS participando en carácter de Investigadoras la Dra. María Guillermina BILBAO, la Dra. Evelin Mariel ELIA (CONICET), la Dra. Ana Inés PORTU y la M.V. Mariela MONDINO; en carácter de Tesista el M.V. Franco Exequiel LUCERO ARTEAGA, en carácter de Asistentes de Investigación las estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Sofía LABEGORRA, Ana ABREGO ALVAREZ y Valentina HECK.

Que tendrá una duración de treinta y seis (36) meses, a partir del 01 de Enero de 2023 y hasta el 31 de Diciembre de 2025.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Básica.

Que participan en su desarrollo el Departamento de Ciencias Básicas, el Centro de Producción de Animales de Experimentación (CePAE) y el Centro de Investigación y de Desarrollo de Fármacos (CIDEF), todo perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que también participarán el Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología, Escuela de Medicina, Universidad de Murcia, España y el Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA- CONICET.

Que el citado proyecto ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5° Anexo I de la Resolución N° 100/99 y su modificatoria N° 88/02 del Consejo Superior, estipula que: *“Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca”*.

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución N° 100/99 y N° 88/02 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por el Dr. Marcelo MIRAGAYA (UBA), la Mg. Susana ORIANI (Investigadora independiente) y el Dr. Claudio PIDONE (UNR).



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 048/2023

//2.-

Que dicho proyecto cuenta con la aprobación del formulario del protocolo institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación bajo la responsabilidad el consejo asesor institucional para el uso y cuidado de animales de experimentación (CAICUAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 02 de Marzo de 2023, puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los/as Sres/as. Consejeros/as, se aprueba por unanimidad.

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

RESUELVE:

ARTICULO 1º: Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: *“Mapeo neuroquímico del cerebro de murciélago urbano y del armadillo peludo gigante: posible herramienta para comprender la patogénesis de la rabia silvestre”* bajo la dirección del Dr. José Luis FERRÁN BERTONE y la co-dirección de la Dra. Mónica Alejandra BOERIS participando en carácter de Investigadoras la Dra. María Guillermina BILBAO, la Dra. Evelin Mariel ELIA (CONICET), la Dra. Ana Inés PORTU y la M.V. Mariela MONDINO; en carácter de Tesista el M.V. Franco Exequiel LUCERO ARTEAGA, en carácter de Asistentes de Investigación las estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Sofía LABEGORRA, Ana ABREGO ALVAREZ y Valentina HECK, el cual tiene trece (13) folios y que se adjunta como Anexo de la presente Resolución.

ARTICULO 2º: El proyecto tendrá una duración de treinta y seis (36) meses, a partir del 01 de Enero de 2023 y hasta el 31 de Diciembre de 2025.

ARTICULO 3º: Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

ARTÍCULO 4º: Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento los/as interesados/as, Secretaría de Investigación y Posgrado. Cumplido, archívese.

Presidente
Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Veterinarias
UNLPam

ANEXO

Documento: 2023-048-RESOLUCION-CD-RECTORIA-UNIVERSIDAD-DE-BUENOS-AIRES

Código seguro de verificación: RUXFMr7-eUbpNFdC-MjS+KMH-Hvu/FckA COPIA ELECTRÓNICA

Esta es una copia electrónica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Buenos Aires, según el artículo 27.3 de la Ley 26.157, de 2 de diciembre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.ub.edu/validador/>



28 de febrero del 2023

De mi mayor consideración, doy mi aval para formar parte del proyecto de investigación presentado por el Dr. José Ferrán Bertone y la Dra. Mónica Boeris denominado "Mapeo neuroquímico del cerebro de murciélago urbano y del armadillo peludo gigante: posible herramienta para comprender la patogénesis de la rabia silvestre".

Saludos cordiales,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Elia', with a horizontal line underneath.

Dra. Evelin Mariel Elia

24 de febrero del 2023

De mi mayor consideración, doy mi aval para formar parte del proyecto de investigación presentado por el Dr. José Ferrán Bertone y la Dra. Mónica Boeris denominado "Mapeo neuroquímico del cerebro de murciélago urbano y del armadillo peludo gigante: posible herramienta para comprender la patogénesis de la rabia silvestre" y del cual seré Tesista.

Saludos cordiales,



Franco Exequiel Lucero Arteaga



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Cs. Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO: Mapeo neuroquímico del cerebro de murciélago urbano y del armadillo peludo gigante: posible herramienta para comprender la patogénesis de la rabia silvestre.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Básica

1.3. AREA DE CONOCIMIENTO: Agropecuarias y del Medio Ambiente

1.4. SUB AREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias Veterinarias

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS

Departamento de Ciencias Básicas, CENTRO DE PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CePAE) y CIDEF. FCV-UNLPam

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

- Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología, Escuela de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, España.
- Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA- CONICET.

2.3. EQUIPO de TRABAJO:

2.3.1 INTEGRANTES

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categ. Invest	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Ferrán Bertone, José Luis	52042958F	Doctor en Medicina, Universidad de Buenos Aires		D	Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología Facultad de Medicina Universidad de Murcia	Profesor Titular E	10

Boeris, Mónica Alejandra	27-14928079/6	Doctora en Biología Universidad Nacional del Sur.	3	CD	Fisiología Animal.	Prof. Asociado Exclusivo.	10
Bilbao María Guillermina.	27-28004454/2	Doctora en Cs. Biológicas, Universidad de Buenos Aires.	4	I	Física Biológica CONICET	Prof. Adjunto. Simple.	10
Lucero Arteaga, Franco Exequiel.	20-36221849/8	Médico Veterinario.	-	Tesista	Virología e Inmunología Básica.	Ayudante de Primera SE	20
Elia, Evelin Mariel	27-28061932-4	Doctora en Cs. Biológicas, Univer. de Bs As	-	I	CONICET	Investigadora Adjunta	5
Portu, Ana Ines	27-31892745/1	Doctora UBA, Bioquímica	-	I	Bacteriología y Micología	JTP SE	5
Mondino, Mariela	27-32279113/0	Médica Veterinaria	-	I	Técnica y Patología Quirúrgica	AY 1° S	5
Labegorra, Sofía	27-44242255/4	Estudiante	-	AI	FCV-UNLPam	estudiante	2
Abrego Alvarez, Ana	27-44322203/6	Estudiante	-	AI	FCV-UNLPam	estudiante	2
Heck, Valentina	27-44007397/8	Estudiante	-	AI	FCV-UNLPam	estudiante	2

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem
MV. Lucero Arteaga, Franco Exequiel	Doctor en Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.	ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA PREVALENCIA DE LYSSAVIRUS EN POBLACIONES DE MURCIÉLAGO URBANO DEL NORTE DE LA PAMPA Y ABORDAJE NEUROQUÍMICO PARA MEJORAR HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO	Universidad de Buenos Aires	PhD Ana Cristina Bratanich	

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

PhD Ana Cristina Bratanich	Director	ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA PREVALENCIA DE LYSSAVIRUS EN POBLACIONES DE MURCIÉLAGO URBANO DEL NORTE DE LA PAMPA Y ABORDAJE NEUROQUÍMICO PARA MEJORAR HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO
Dr. María Guillermina Bilbao	Co-Director	
MV. Franco Exequiel Lucero Arteaga	Tesista	

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 2 a 5 años con una sola prórroga)

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2023

FINALIZACIÓN: 31 / 12/ 2025

4. RESUMEN del PROYECTO:

La rabia es una zoonosis de distribución mundial responsable de alrededor de 60.000 muertes humanas al año, siendo los continentes más afectados Asia, África y en tercer lugar Sudamérica (OMS, 2016). En Argentina, el riesgo de transmisión al ser humano, está limitado casi exclusivamente a la circulación viral en animales silvestres, siendo los murciélagos del género *Tadarida* los de mayor importancia epidemiológica debido a que comparten su nicho biológico con el hombre. Por lo que, la realización de un detallado mapeo neuroquímico del cerebro de murciélago urbano sentará las bases fundamentales que permitan explorar e identificar estructuras y/o regiones cerebrales específicas. La caracterización obtenida podrá ser utilizada a posteriori como una herramienta para la evaluación del comportamiento viral en el SNC (que estructuras y/o regiones cerebrales se ven preferentemente afectadas). Para poder alcanzar los objetivos del estudio nos proponemos realizar la captura de los animales en zonas urbanas del norte de La Pampa, se procederá a extraer los cerebros para su posterior procesamiento. Las secciones se obtendrán de forma coronal, sagital y transversal al hipotálamo en crióstato, se montarán de forma seriada en portaobjetos y se determinará la presencia de distintos marcadores neuroquímicos por inmunohistoquímica, con el fin de obtener mayor alcance en el tejido y así generar el mapa propuesto.

4.1 Palabras claves: armadillo peludo gigante/ murciélago urbano/ cerebro murciélago/ mapeo neuroquímico

4.2 Abstract en Inglés:

Rabies is a globally distributed zoonosis responsible for about 60,000 human deaths per year. The most affected continents are, Asia, Africa and South America (WHO, 2016). In Argentina, the risk of transmission to humans is limited almost exclusively to viral circulation in wild animals. Bats of the genus *Tadarida* are the most important epidemiologically because they share their biological niche with humans. Therefore, the realization of a neurochemical mapping of the urban bat brain will provide the fundamental basis for the exploration of specific brain structures and/or regions, which can be used as a tool for the evaluation of viral behavior in the CNS a posteriori. In order to achieve the study we propose to capture the animals in urban areas of northern La Pampa and to extract the brains for further processing. The sections will be obtained coronal, sagittal and transverse to the hypothalamus in cryostat, will be serially mounted on slides and the presence of different neurochemical markers will be determined by immunohistochemistry, in order to obtain greater reach in the tissue and thus generate the proposed map.

4.3. Key words: big hairy armadillo / urban bat / bat brain / neurochemical mapping

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

La rabia es una zoonosis de distribución mundial responsable de alrededor de 60.000 muertes humanas al año, siendo los continentes más afectados Asia, África y en tercer lugar Sudamérica (WHO, 2016). En términos generales, el principal riesgo de que un ser humano contraiga la enfermedad está dado por el contacto con caninos o felinos domésticos infectados. Sin embargo, en las últimas décadas, la rabia humana transmitida por murciélagos ha reaparecido como un problema de salud pública en las Américas. Datos registrados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) revelaron que hubo 678 casos reportados de rabia humana en América Latina en el periodo comprendido entre 1990 y 2010, siendo 240 de esos casos transmitidos por murciélagos (Fernandes de Almeida et al; 2011). En los últimos años se registraron eventos de rabia humana transmitida por murciélagos en Ecuador y Perú, en el resto de los países del cono sur se han reportado casos positivos al virus en especies pertenecientes al orden Chiroptera, lo que hace a estos animales uno de los principales reservorios de la enfermedad en la región. Es preciso señalar que los casos de rabia transmitida por esta especie, ocurren mediante infecciones accidentales, donde una persona, generalmente menor, entra en contacto con el animal enfermo que inocula el virus por medio de mordidas. Por otra parte, *Chaetophractus villosus*, conocido vulgarmente por el nombre de “peludo pampeano” o “armadillo peludo gigante”, es un mamífero que constituye a la fauna autóctona argentina. Tiene una amplia distribución a lo largo de todo el país, limitándose generalmente a regiones áridas y semiáridas que van desde el sur de Bolivia y Paraguay, hasta la Isla Grande de Tierra del Fuego. Sin embargo, su notable capacidad para adaptarse a diferentes climas y recursos alimentarios diversos, les ha permitido poder establecerse en lugares más húmedos como la región agrícola de la llanura pampeana, lo que significó un problema para la producción de cultivos en la zona. Volviéndose, con el paso del tiempo, uno de los mamíferos más comunes en los agroecosistemas de Argentina. Esto llevó a la existencia de una alta interacción con los seres humanos en varios aspectos importantes para su estudio.

Como se nombró anteriormente *C. villosus* tiene gran plasticidad en cuanto a sus hábitos alimentarios, son animales omnívoros por excelencia. Su dieta se basa en el consumo de productos de origen vegetal que tienen a su disposición, muchas veces interfiriendo con la producción de sistemas agrícolas ganaderos, lo que a menudo termina en la destrucción de sistemas de almacenamiento de granos como es el caso de los “silo bolsa”. Sumado a esto, la construcción de cuevas provoca daños en instalaciones de sistemas productivos, lo que conlleva a pérdidas económicas significativas a los productores locales. Por otra parte, su dieta también se compone por el

consumo pequeños animales de diversos tipos como roedores, reptiles y aves, lo que podría sugerir un rol benéfico en el control de plagas. Sin embargo, se ha comprobado que *C. villosus* tiene hábitos carroñeros, llegando a consumir cadáveres de distintos animales, fetos abortados, restos de placenta, etc. por otro lado también se han encontrado cuevas y especímenes de esta especie en cementerios locales, donde han provocado la destrucción de ataúdes de personas fallecidas, lo que sugiere que también los cadáveres humanos pueden ser una fuente de alimento para *C. villosus*.

Por lo que su amplia distribución, alta tolerancia al cambio de hábitat, y gran población en diferentes áreas protegidas del país, esta especie de armadillos es considerada como especie de preocupación

menor, dentro de la lista roja 2019 de la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM) <http://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/chaetophractus-villosus>.

Además de ser animales que interfieren en las actividades de sistemas agroganaderos, trabajos realizados por otros autores, han identificado en ejemplares de esta especie patógenos de importancia epidemiológica, como *Brucella sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Leptospira sp.*, *Neospora caninum*, entre otras. Lo que significa que pueden ser reservorios y/o amplificadores de distintas enfermedades de importancia en medicina veterinaria y humana. Sumado a esto, *C. villosus* es cazado y consumido de forma artesanal principalmente por personas que viven en zonas rurales o periurbanas, pudiendo ser una fuente de infección de importancia en la salud pública.

En Argentina, gracias a las exhaustivas campañas nacionales de vacunación antirrábica de caninos y felinos para el control y erradicación de la rabia (impulsadas por el Ministerio de Salud de la Nación), se ha minimizado el riesgo de transmisión al ser humano, limitando la enfermedad casi exclusivamente a la circulación viral en animales silvestres, siendo el murciélago la especie de mayor importancia epidemiológica. Dentro de este grupo se pueden mencionar los pertenecientes al género *Tadarida* o “murciélagos urbanos” debido a que comparten su nicho biológico con el hombre. Cabe destacar que la rabia es una de las enfermedades desatendidas que afecta principalmente a poblaciones de países emergentes y en general, los casos de muerte en animales causada por rabia raramente se notifican.

El agente etiológico de esta zoonosis es un virus RNA lineal, no segmentado y de polaridad negativa del género *Lyssavirus* perteneciente al orden Mononegavirales y a la familia

Rhabdoviridae. Según la entidad internacional especializada en taxonomía de virus “International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)”, se admiten 16 especies de *Lyssavirus* causantes de esta enfermedad, distribuidas en todos los continentes a excepción de la Antártida. Los virus pertenecientes a este género son altamente neurotrópicos por lo que afectan principalmente al sistema nervioso central de una amplia variedad de mamíferos, incluido el hombre. Lo que da como resultado un cuadro clínico que se caracteriza por la presentación de encefalomielititis aguda grave e invariablemente mortal.

En la actualidad se cuenta con tratamientos posexposición, como la administración de vacunas antirrábicas de alta potencia en conjunto con inmunoglobulina antirrábica, con el fin de evitar la aparición de sintomatología nerviosa. Si bien dicho tratamiento puede tener un resultado benéfico para el paciente, es necesario tener en cuenta que debe efectuarse de forma inmediata luego de la exposición, ya que la finalidad de la utilización de biológicos en este caso es evitar la llegada del virus al sistema nervioso del huésped; caso contrario, una vez alcanzado el sistema neuronal, la manifestación de la enfermedad es inevitable, alcanzando un 100 % de letalidad (OMS, 2018). Por lo tanto, se propone realizar un estudio neuroanatómico del cerebro del *Tadarida sp.*, mediante técnicas de inmunohistoquímica que permitan la realización de un mapeo neuroquímico para el estudio de las regiones del cerebro y sus principales núcleos (Nagalski et al., 2013; Santana et al., 2017). Nuestra hipótesis es que este estudio dará la base fundamental para la exploración del comportamiento viral en estructuras y/o regiones cerebrales del murciélago urbano, permitiendo determinar la localización específica o

preferente del virus rábico en el sistema nervioso central, dando la posibilidad de explicar la signología característica de la infección en estos animales y proporcionar información útil para el diagnóstico de la enfermedad. La exploración de patrones básicos tales como los catecolaminérgicos permitirán comparar el cerebro del murciélago y del armadillo peludo gigante con el de otros mamíferos muy bien caracterizados, para de esta forma identificar estructuras cerebrales homólogas que permitan a futuro reconocer si existen blancos virales preferentes.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

-Albuixech Crespo, B.; López Blanch, L.; Burguera, D.; Maeso, I.; Sánchez Arrones, L.; Moreno-Bravo, J.A.; Somorjai, I.; Pascual Anaya, J.; Puelles, E.; Bovolenta, P.; Garcia Fernández, J.; Puelles, J.; Irimia, M.; Ferran, J.L., (2017). Molecular regionalization of the developing amphioxus neural tube challenges major partitions of the vertebrate brain. PLoS Biol 15(4) <https://doi.org/10.1371>.

-Alonso, A.; Merchán, P.; Sandoval, J. E.; Sánchez-Arrones, L.; Garcia-Cazorla, A.; Artuch, R.; Ferrán, J.L.; Martínez de la Torre, M.; Puelles, L. (2013). Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. Brain Struct Funct (2013) 218:1229–1277 DOI 10.1007/s00429-012-0456-8.

-Ferran, J.L., Dutra De Oliveira, E.; Merchán, P.; Sandoval, J.E.; Sánchez Arrones, L.; Martínez De La Torre and Puelles, L. (2009). Genoarchitectonic Profile of Developing Nuclear Groups in the Chicken Pretectum. The Journal of Comparative Neurology 517:405–451, <https://doi.org/10.1002/cne.22115>.

-Nagalski, A.; Irimia, M.; Szewczyk, L.; Ferran J.L.; Misztal, K.; Kuznicki, J.; Wisniewska, M.B. (2013). Postnatal isoform switch and protein localization of LEF1 and TCF7L2 transcription factors in cortical, thalamic, and mesencephalic regions of the adult mouse brain. Brain Struct Funct, Noviembre de 2013, Volumen 218, Número 6, págs. 1531–1549 <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0474-6>.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Las especies pertenecientes al orden Chiroptera se han identificado como uno de los principales reservorios del virus de la rabia, en su ciclo silvestre. Siendo los murciélagos urbanos o *Tadarida sp.* los de mayor importancia epidemiológica en urbes de Argentina, principalmente en la región central de país. De la misma manera, los armadillos de la especie *C. villosus* pueden ser el reservorio de diferentes tipos de patógenos que afecten tanto a los seres humano como a los animales domésticos. En la actualidad poco se sabe sobre la citoarquitectura cerebral de estos animales que pueda ser de utilidad para el estudio de infecciones virales.

Objetivo:

Elaborar un mapa neuroquímico del cerebro del murciélago urbano y del armadillo peludo gigante, utilizando marcadores neuronales específicos para describir estructuras cerebrales con el fin de identificar a futuro posibles blancos virales.

Hipótesis: La realización de un mapa neuroquímico del cerebro de murciélago urbano y del armadillo peludo gigante dará la base fundamental para la exploración del comportamiento viral en estructuras y/o regiones cerebrales. El mapeo cerebral será una herramienta clave, para el estudio posterior de la signología característica en murciélagos infectados por Lyssavirus.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

La captura de los murciélagos se llevará a cabo mediante la utilización de redes de nieblas que proporcionará el método más adecuado y seguro para la captura de estos animales (Costa et al., 2017; Bracamonte, 2018). Seguido a esto, serán transportados vivos hasta el CENTRO DE PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CePAE) de la FCV, UNLPam, en un lapso no mayor a las 4 h, en bolsas de telas individuales con el fin de evitar lesiones y malestar en los animales, como asítambién brindar seguridad para los operarios, hasta su eutanasia.

En el caso de los armadillos, serán alcanzados por personas oriundas de los campos de la zona, en cajas de transportes. Luego de esto, serán alojados en instalaciones pertenecientes al CENTRO DE PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (CePAE) de la FCV, UNLPam.

A partir de $n = 10$ animales de cada especie capturados en las zonas urbanas del norte de La Pampa como se describió anteriormente, se procederá a extraer los cerebros para su posterior procesamiento. Brevemente, los animales se anestésiarán profundamente mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico y se perfundirán aplicando buffer fosfato salino (PBS) 0.1 M, pH 7.4, seguido de paraformaldehído al 4 % en PBS 0.1 M, pH 7.4 por ventrículo izquierdo. Inmediatamente, se extraerá el cerebro y se fijará en paraformaldehído al 4 % en agitación durante 20 h, luego se crioprotegerán en sacarosa al 30 % a -20°C . Las secciones se obtendrán de forma coronal, sagital y transversal al hipotálamo en criótomo a $40\ \mu\text{m}$, o en su defecto crióstato se montarán de forma seriada en portaobjetos y se determinará la presencia por inmunohistoquímica (IHQ) de distintos marcadores neuroquímicos, como tirosina hidroxilasa (TH), adenosin Vasopresina (AVP), calretinina, NOS (nNOS), CCK, neuropéptido Y (NPY), encefalina, transportador de glutamato (VGlut2) y glutamato decarboxilasa (GAD67). Se realizará un blanqueo con H_2O_2 al 0.3 % por 10 min, seguido de tres lavados en PBS conteniendo triton X-100 (PBST) 0.2 % por 10 min, bloqueo con suero de la especie indicada en PBST por 30 minutos de incubación con los anticuerpos primarios seleccionados en PBST 1 %. Luego de los lavados, las secciones se incubarán con anticuerpos secundarios específicos biotinilados. La adición de 3,3'-diaminobenzidina permitirá la visualización de la marca específica. Las imágenes se obtendrán con microscopio Nikon eclipse Ni-U con cámara acoplada y se procesarán con Adobe Photoshop CS4. (Ahmad et al. 2017; Albuixech Crespo et al. 2017; Nagalski et al., 2013; Rodenas Cuadrado et al. 2017; Schwartz et al. 2008; Zhang et al. 2013).

6.2 CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Es posible que el estudio de la citoarquitectura cerebral de los murciélagos urbanos pueda contribuir al estudio del comportamiento de infecciones virales, como es el caso de *Lyssavirus*, permitiendo estudiar a futuro mecanismos de diseminación y lesión neuronal causadas por virosis nerviosas y evaluación de signos en animales con dichas infecciones. Por otro lado, la importancia de estudiar a nivel neuroquímico el cerebro de los armadillos peludos gigantes, recae en la importancia en la salud pública que tiene estos animales debido a sus hábitos naturales, como son el alimentarse de cadáveres de diversos tipos, muchas veces murciélagos, su amplia distribución, y el estrecho contacto con los seres humanos, siendo muchas veces animales destinados al consumo.

Al tratarse de especies que actúa como reservorio de infecciones virales zoonóticas, creemos que es un estudio valioso, que puede contribuir en el futuro a avances científicos en el campo de enfermedades infecciosas, ayudando a aumentar las técnicas diagnósticas para la detección de animales sospechosos de rabia.

6.3. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES**Año 1**

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Captura de animales	X	X	X	X	X							
Extracción de cerebros	X	X	X	X	X							
Tratamiento	X	X	X	X	X							
Corte y montaje						X	X					
Determinación de presencia de Marcadores específicos porIHQ								X	X	X		
Generación y procesamiento de imágenes										X	X	X
Evaluación preliminar de ensayos						X				X		
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Año 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Captura de animales	X	X	X	X	X							
Extracción de cerebros	X	X	X	X	X							
Tratamiento	X	X	X	X	X							
Corte y montaje						X	X					
Determinación de presencia de Marcadores específicos porIHQ								X	X	X		
Generación y procesamiento de imágenes										X	X	X
Evaluación preliminar de ensayos						X				X		
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Publicación y difusión de Resultados										X	X	X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:**

El procesamiento de muestras y el análisis de datos se llevarán a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) y en el CENTRO DE PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE

EXPERIMENTACIÓN (CePAE) de la FCV, UNLPam, localizados en el mismo predio. Las instalaciones de ambos son las adecuadas para el desarrollo de tareas de investigación, con espacio físico suficiente para albergar a un grupo de trabajo; áreas de escritorio con computadoras e impresoras, y áreas de laboratorios en completo funcionamiento: mesadas, piletas, autoclaves, lupa, microscopios de campo claro, baño térmicos, destilador, agitadores magnéticos, campanas de seguridad, centrífuga de mesada, centrífuga y microcentrífuga refrigerada, freezer de -80°C, freezer de -20°C, heladera, balanzas analíticas y de precisión, etc.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

Para a obtención de cortes con criótomo, o en su defecto crióstato se recurrirá al IFIBYNE, FCEN, UBA-CONICET. La Dra. Elia, integrante de este Proyecto de Investigación, aportará los conocimientos prácticos para la manipulación del equipamiento mencionado.

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

El manejo de los cerebros, desde la fijación hasta la IHQ, se realizará bajo la supervisión del Dr. José Luis Ferrán, Universidad de Murcia, España. Los fondos para la obtención de anticuerpos detallados anteriormente (incluidos anticuerpos secundarios), kit de revelados para IHQ y algunos materiales básicos para el procedimiento provendrán del Subsidio N° 17482 "Genoarquitectura funcional" cuyo Investigador responsable es el propio Dr. Ferrán.

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)

Año 1:

Equipamiento e Infraestructura (redes de niebla).....	\$5000
Bienes de Consumo (Guantes, anestésicos, guantes de cuero, agujas, jeringas, solución fisiológica, instrumental quirúrgico, sales, etc.).....	\$9000
Bibliografía (impresión de poster, afiches, etc para presentación a jornadas)	
Viajes (presentación a congresos y jornadas).....	\$6000.
Total.....	\$20000

Año 2:

Bienes de Consumo (Guantes, anestésicos, guantes de cuero, agujas, jeringas, solución fisiológica, instrumental quirúrgico, sales, etc.).....	\$8000
Bibliografía (impresión de poster, afiches, etc para presentación a jornadas).....	\$3000
Viajes (presentación a congresos y jornadas).....	\$9000.
Total.....	\$20000

** El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.*

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, W.; Yingying L.; Guo, Y.; Wang, X., Duan, M.; Guan, Z.; Liu, Z.; Zhang, M. (2017). Rabies virus co-localizes with early (Rab5) and late (Rab7) endosomal proteins in neuronal and SH-SY5Y cells. *VIROLOGICA SINICA*. DOI: 10.1007/s12250-017-3968-9.
- Albuixech Crespo, B.; López Blanch, L.; Burguera, D.; Maeso, I.; Sánchez Arrones, L.; Moreno Bravo, J.A.; Somorjai, I.; Pascual Anaya, J.; Puellas, E.; Bovolenta, P.; Garcia Fernández, J.; Puellas, J.; Irimia, M.; Ferran, J.L., (2017). Molecular regionalization of the developing amphioxus neural tube challenges major partitions of the vertebrate brain. *PLoS Biol* 15(4) <https://doi.org/10.1371>.
- Alonso, A.; Merchán, P.; Sandoval, J. E.; Sánchez-Arrones, L.; Garcia-Cazorla, A.; Artuch, R.; Ferrán, J.L.; Martínez de la Torre, M.; Puellas, L. (2013). Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. *Brain Struct Funct*. 218:1229–1277 DOI 10.1007/s00429-012-0456-8.
- Bracamonte, B. (2018). Protocolo de muestreo para la estimación de la diversidad de murciélagos con redes de niebla en estudios de ecología. *Ecología Austral* 28: 446-454 doi.org/10.25260/EA.18.28.2.0.272.
- Costa, L.; Martorell, F.A.; Baroneb, G.; Rosac, T.; Vasconcelos, F.C.; Pereira, A.S.; Fernandes, M.E.B. (2017). Seroprevalence of rabies virus antibodies in bats from high risk areas in Brazilian Amazonia between 2013 and 2015. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 111: 363–369. doi:10.1093/trstmh/trx069.
- Fernandes de Almeida, M.; Alves Martorelli, L.F.; Martos Sodré, M.; Arruda, A.P., (2011). Rabies diagnosis and serology in bats from the State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(2):140-145. DOI: 10.1590/S0037-86822011005000011.
- Ferran, J.L., Dutra De Oliveira, E.; Merchán, P.; Sandoval, J.E.; Sánchez Arrones, L.; Martínez La Torre; Puellas, L. (2009). Genoarchitectonic Profile of Developing Nuclear Groups in the Chicken Pretectum. *The Journal of Comparative Neurology* 517:405–451, <https://doi.org/10.1002/cne.22115>.
- Nagalski, A.; Irimia, M.; Szewczyk, L.; Ferran J.L.; Misztal, K.; Kuznicki, J.; Wisniewska, M.B. (2013). Postnatal isoform switch and protein localization of LEF1 and TCF7L2 transcription factors in cortical, thalamic, and mesencephalic regions of the adult mouse brain. *Brain Struct Funct*, Volumen 218, Número 6, págs. 1531–1549 <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0474-6>.
- Rodenas Cuadrado, R.; Mengede, J.; Baas, L.; Devanna, P.; Schmid, T.A.; Yartsev, M.; Uwe Firzlaff; Vernes, S.C., (2017). Mapping the distribution of language related genes FoxP1, FoxP2, and Cntna2 in the brains of vocal learning bat species. *The Journal of Comparative Neurology*. 526:1235–1266. DOI: 10.1002/cne.24385.
- Santana, N.N.M.; Barros, M.; Medeiros, H.H.; Santana, H.; Silva, L.; Morais, P.; Ladd, F.; Cavalcante, J.; Lima, R.; Cavalcante, R.; Costa, M.; Engelberth, R.; Nascimento, E. Jr. (2017). The Suprachiasmatic Nucleus and the Intergeniculate Leaflet of the Flat-Faced Fruit-Eating Bat (*Artibeus planirostris*): Retinal Projections and Neurochemical Anatomy. *Frontiers in Neuroanatomy*. doi: 10.3389/fnana.2018.00036.
- Schwartz, C.; Bartell, P.; Cassone, V.; Smotherman, M.; (2008). Distribution of 2-[125I]iodomelatonin Binding in the Brain of Mexican Free-Tailed Bats (*Tadarida brasiliensis*). *Brain Behavior and Evolution* 73:16–25 DOI:10.1159/000202987.
- World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/rabies>
- Zhang, Y.; Zhu, T.; Wang, L.; Zhang, S. (2013). Homocysteine Homeostasis and Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Expression in the Brain of Hibernating Bats. *PLoS ONE* 8(12). doi:10.1371/journal.pone.0085632.