

LOS ENTEROVIRUS Y LA ULTRAESTRUCTURA DE LAS CELULAS AFECTADAS

— **Dr. Otto Núñez Montiel**

Laboratorio de Estudio de la Gastroenteritis.

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.).

Conferencia dictada en Maracaibo, el 4 de abril de 1963, en el Instituto de Investigación Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

Los virus son agentes infecciosos parásitos obligados, carentes de metabolismo, partículas sub-microscópicas y cuya composición química primordial es el ácido nucleico. De éstos, los enterovirus son partículas de 28 a 30 $m\mu$ compuesto por ácido ribonucleico (ARN) resistente al alcohol, éter y detergentes, estabilidad catiónica a la inactivación térmica. Algunos serotipos producen lesiones neurológicas a primates y a roedores, otros producen lesiones musculares, pancreáticas, atacan la grasa embrionaria de ratones, y a otros, no se les conoce patogenicidad alguna. Patógenos para células cultivadas de algunos primates (Rhesus y Cynomolgus), para células cultivadas de fetos humanos. Algunos atacan las células HeLa, KB y Hep-2. Algunas cepas se multiplican mejor en temperaturas de 33 y 34° en medio ligeramente acidificado. Algunas cepas poseen hemaglutinina y antígeno que fija el complemento (C)' Estas dos últimas propiedades son importantes porque permiten un diagnóstico hospitalario rápido.

Son muchas las enfermedades y síndromes que pueden ser ocasionados por los enterovirus, a saber poliomielitis, meningitis aséptica, encefalitis, posiblemente el síndrome de Guilliam-Barré, diarrea aguda febril, neumonías atípicas, faringitis, pleurodinias, herpangina, miocarditis, pericarditis, miositis, (mialgias), conjuntivitis, fiebres benignas exantemáticas y posiblemente hepatitis y algunos síndromes gripales. En el campo experimental se ha reportado la pancreatitis (ratón).^{2, 3, 4, 5, 6, 7, 8}

Los enterovirus se dividen en humanos y de animales. Entre los primeros tenemos poliovirus, Coxsackie A y B, y ECHO virus. De los enterovirus animales podemos mencionar los ECMO, de monos; ECBO, de bovinos; ECSO, de cerdos, etc. Recientemente en el último Congreso de Microbiología realizado en Montreal, Canadá, 1962, se aprobó el término Picornavirus (del griego Pico: pequeño; y RNA que se refiere a la composición bioquímica) que engloba todos los virus pequeños de humanos y animales de composición ARN, por lo tanto, los enterovirus quedan englobados. Dividiendo los Picornavirus humanos en enterovirus (con los grupos mencionados anteriormente), rinovirus (llamados también corizavirus o murivirus), y virus no clasificado.⁹

Hay algunos virus que tienen grandes similitudes con los enterovirus y que están mal agrupados, son los llamados Parapoliavirus o grupo Col SK, con varias cepas a saber "MM", "MC", "Mengo", "AK", "F", etc. que causan generalmente meningoencefalomielitis en roedores. Difieren de los enterovirus en que poseen un amplio espectro patogénico para roedores y hemaglutinantes.¹⁰ Otros virus, como los Reovirus pertenecieron en un tiempo a los enterovirus y que luego fueron excluidos por tener propiedades diferentes.¹¹ Mencionemos estos virus porque al hacer la comparación de la ultraestructura veremos algunas similitudes.¹²

Durante dos años hemos realizado estudios sobre la citopatología de algunos serotipos de enterovirus infectando células primarias de riñón de mono Rhesus, HeLa y Kb, infectadas con Poliovirus I, cepa Mahoney; Poliovirus III, cepa Saukett; Coxsackie A9, cepa Grigg; Coxsackie B3, cepa Nancy; Coxsackie B5, cepa Faulkner; ECHO I, cepa Farouk; ECHO 6, cepa D'Amori; ECHO 9, cepa HEV-3; ECHO 11, cepa Gregory; ECHO 13, cepa Hamphill y ECHO 19, cepa Burke.¹²

Las células infectadas aparecen al microscopio óptico redondeadas, con tendencia a aislarse de sus vecinas. El núcleo es rechazado hacia la periferia y es más denso. Contrasta con las células normales, las cuales son poligonales, en contacto directo con sus vecinas, núcleos ovalados y nucleolos puntiformes. Los enterovirus no dan cuerpo de inclusión (Fig. 1). Desafortunadamente no es posible apreciar mayores detalles.

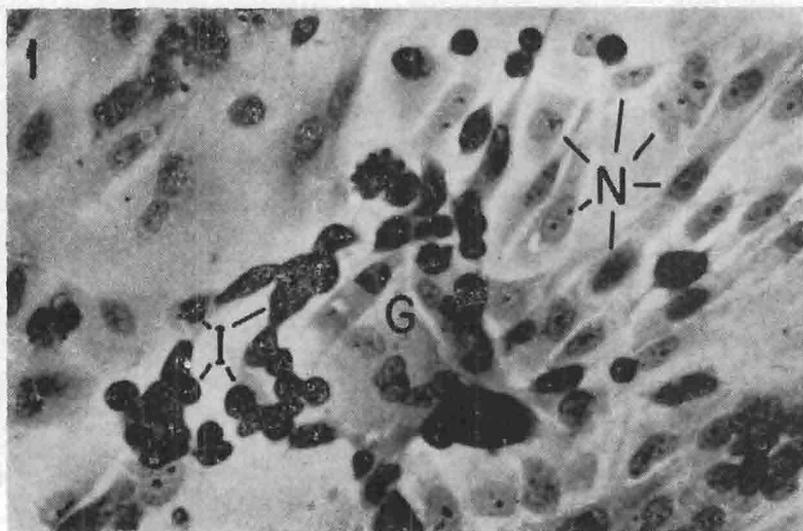
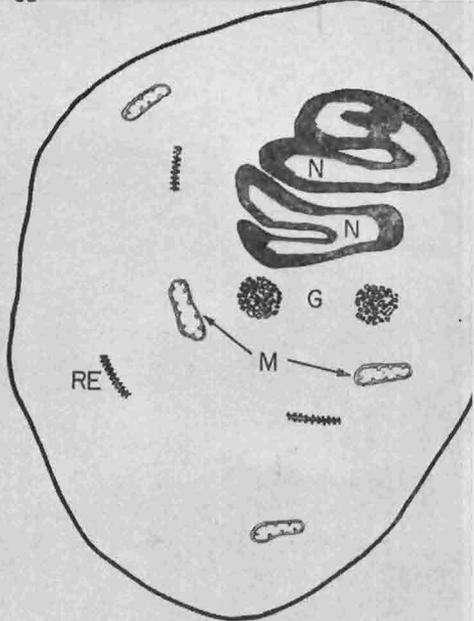
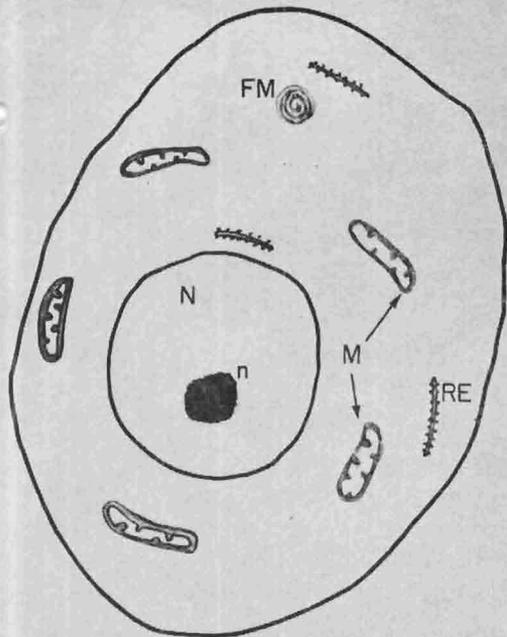
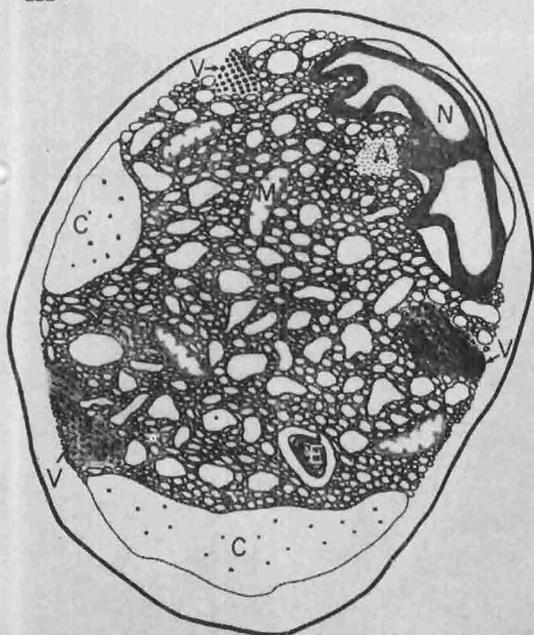


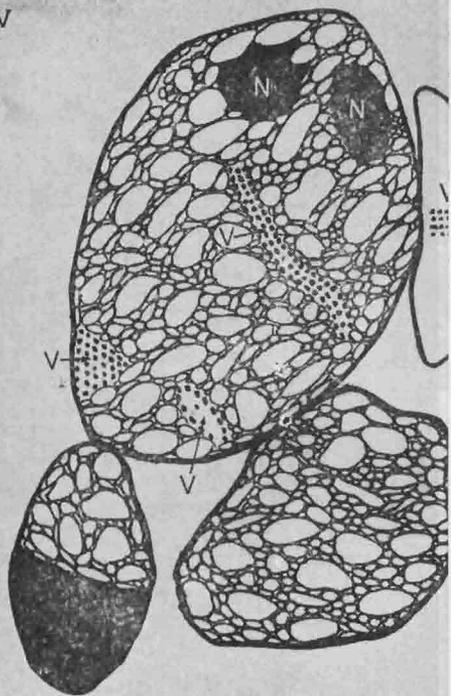
Figura 1. Células de riñón de mono infectadas con poliovirus I. Las células atacadas aparecen redondeadas y más densas que las normales. Tienden a aislarse de las vecinas. Las células normales (N), son poligonales con núcleos globulosos centrales, con nucleolos puntiformes. Además se observan dos policariocitos (G). Hematoxilina-eosina. X 110.



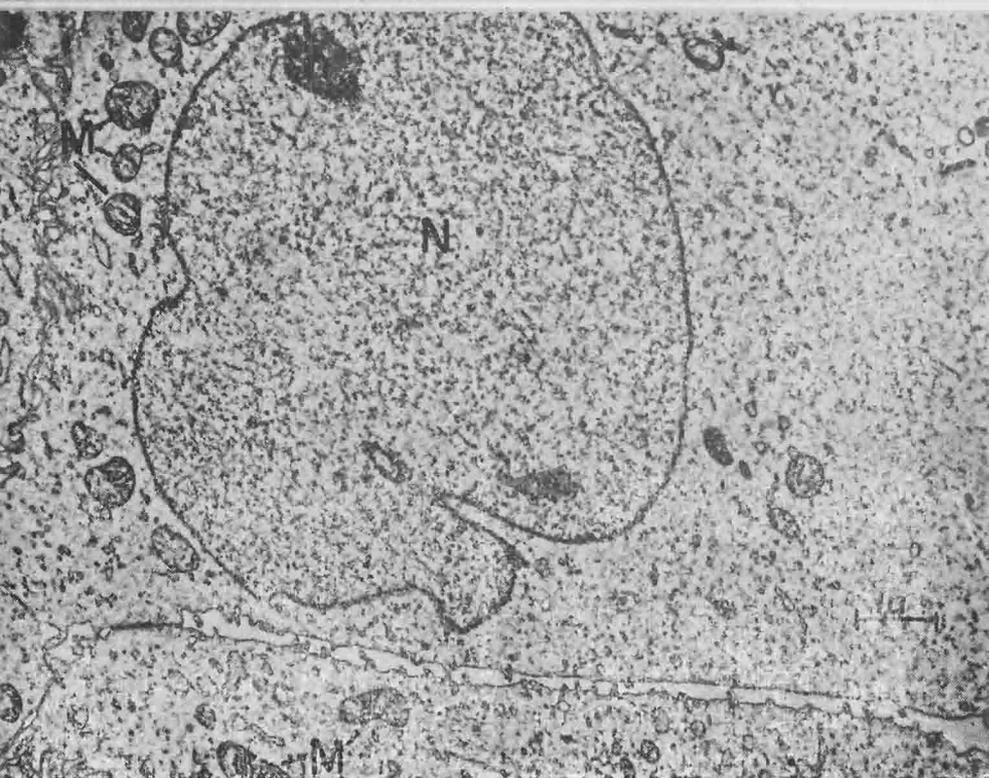
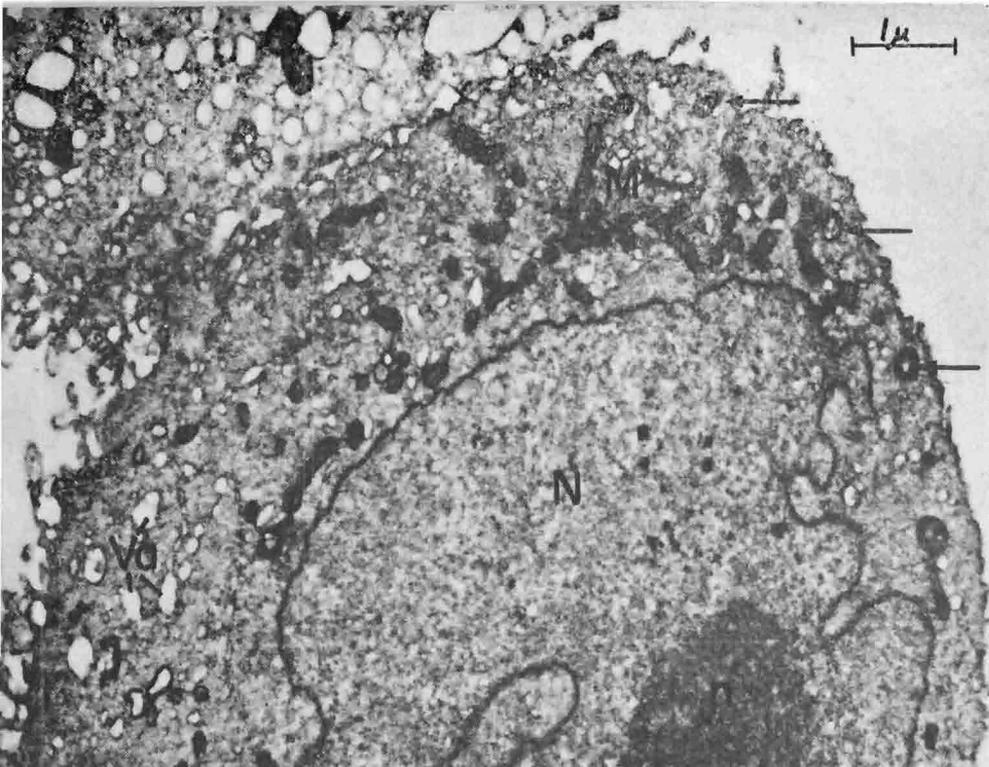
III



IV



Gráfica I. Representa la célula normal al microscopio electrónico con un núcleo (N), globuloso y regular, con nucleolo pequeño. En el citoplasma se aprecian algunas mitocondrias (M), bandas de retículo endoplasmático (RE), y algunas tipo mielínicas (FM). Gráfica II. Representa una célula infectada en la etapa inicial, con su núcleo (N), irregular y condensación cromática en la periferia. En el citoplasma aparecen acúmulos de vesículas y vacuolas que recubren el complejo de Golgi (G). Gráfica III. Representa una célula infectada en etapa intermedia con el núcleo (N), rechazado a la periferia, más denso, con separación de las dos membranas de la envoltura nuclear. El citoplasma aparece transformado en una esponja por la gran cantidad de vacuolas (V), vesículas y cisternas (C). Entre ellas, mitocondrias (M), masas de ADN, con partículas virales, gránulos de ARN (A), cristales virales (V), y cuerpos espirales (E). Gráfica IV. Representa una célula infectada en la etapa final, mostrando mayormente detritos y células con cariéresis o cariólisis (N). Entre las diferentes estructuras virales (V).



2. Microfotografía mostrando una célula normal con su núcleo (N), nucleolo (n), mitocondrias (M), algunas vacuolas tipo mielínico (flecha). X 14.000. Figura 3. Otra célula normal mostrando un citoplasma muy escaso en orga-
 Se aprecian núcleo (N), nucleolo (n), y mitocondrias. X 11.000.

Al microscopio electrónico la célula normal cultivada muestra un núcleo globuloso, con nucleolo pequeño y cromatina escasa y fina. En el citoplasma aparecen escasas mitocondrias, algunas bandas de retículo endoplasmático y rara vez se observan estructuras de Golgi. Con frecuencia presentan algunos cuerpos laminares, como figuras mielínicas,¹² (Graf. 1, Fig. 2 y 3).

Las células infectadas presentan un núcleo irregular con condensación cromatínica en la periferia, nucleolo prominente, y empiezan a aparecer focos vesiculares que recuerdan la estructura de Golgi (Graf. 2, Fig. 4). La célula se va vacuolizando, quedando como una esponja en la etapa intermedia de la infección formada por gran cantidad de vesículas y vacuolas de diferentes tamaños. Las mitocondrias aparentemente resisten la infección. Aparecen nuevas estructuras espirales formadas a partir de masas citoplasmáticas que se aíslan, laminándose sobre un eje central. Estas espiras no presentan nunca organoides, ni partículas virales en su interior. Permanecen unidas al citoplasma por un puente citoplasmático. Algunos autores como Prince consideran estas espiras como un mecanismo de defensa. El núcleo en la etapa intermedia

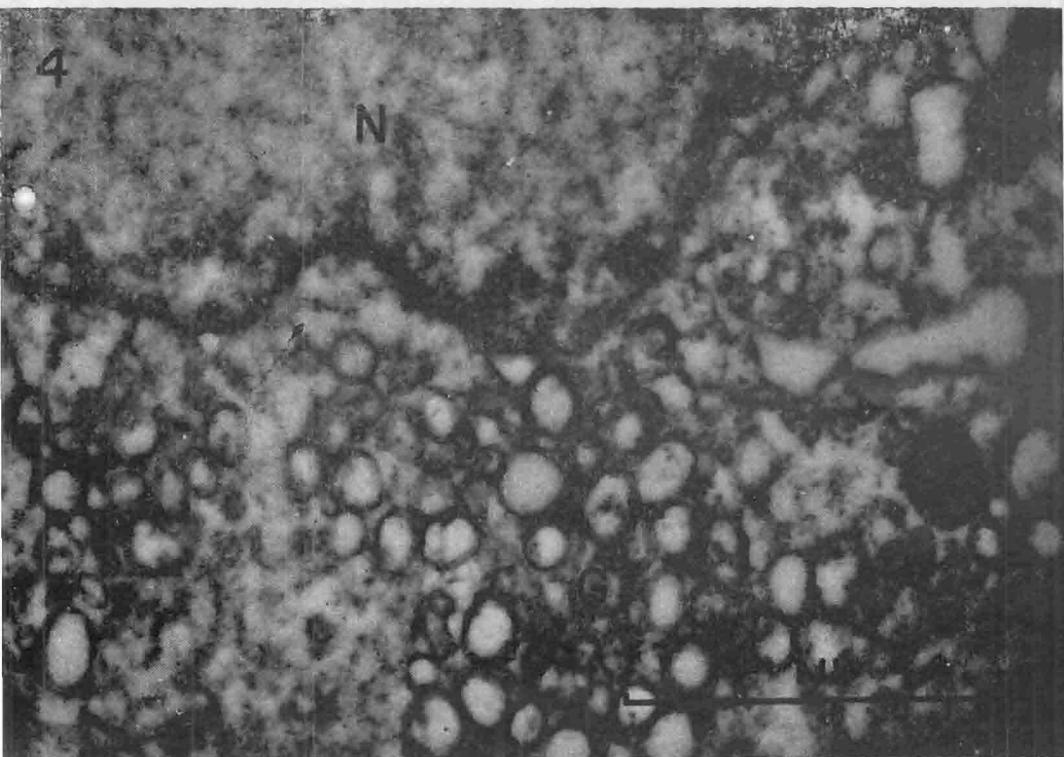


Figura 4. Microfotografía de una célula infectada por enterovirus, mostrando un núcleo (N) con marginación cromática y en el citoplasma focos de vesículas y vacuolas (G). Además se aprecian algunas mitocondrias. X 51.000.



Figura 5. Microfotografía mostrando una célula en la etapa intermedia de la infección por enterovirus. Las letras identifican las estructuras. X 19.000.

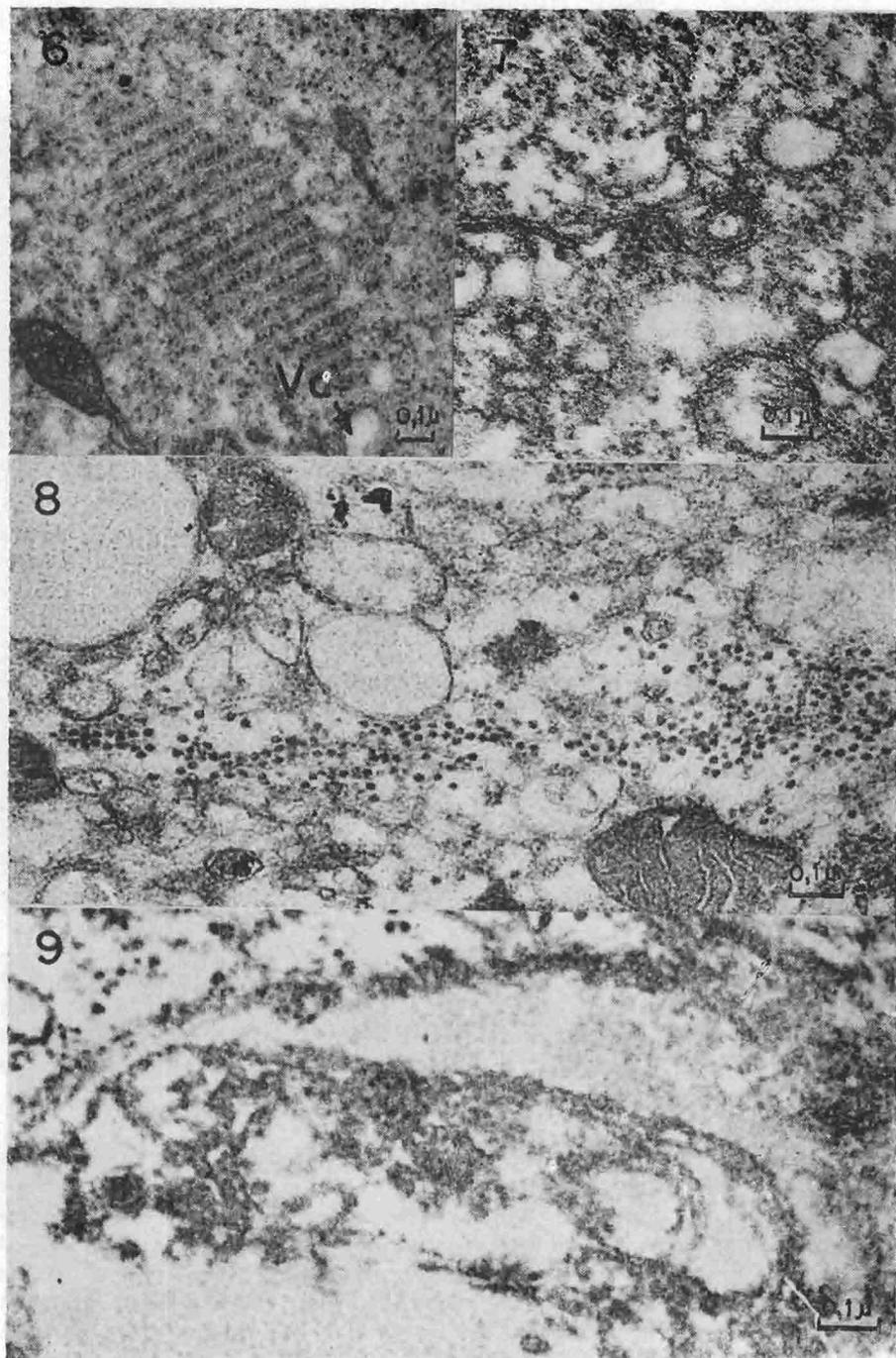


Figura 6. Cristal viral en una célula de riñón de mono infectado por ECHO virus 19, en una etapa intermedia. Las partículas están formando hileras, las cuales están separadas 2.5 veces la distancia entre partículas. El tamaño aproximado fue de 14.5 mu. Una cuidadosa observación revelará bandas semidensas, separadas por bandas claras entre las hileras. A un extremo del cristal hay una partícula grande no viral (flecha). Nótese la conservación de la mitocondria (M) cercana. También hay algunas vacuolas (Va). X 50,000. Figura 7. Pequeño cristal de ECHO-virus 6 en células de riñón de mono. Las partículas están equidistantes. El tamaño aproximado de las partículas fue calculado 14.4 mu. A su alrededor hay algunas vacuolas y parte de una mitocondria. X 64,000. Figura 8. Hileras de partículas de Cocksackie virus B5 en célula de riñón de mono. En un lado éstas aparecen desordenadas. El tamaño aproximado de las partículas fue de 18 mu. El estado de infección es avanzado. X 73,000. Figura 9. Pequeña formación en hileras de ECHO-virus 6 en una célula de riñón de mono. El tamaño aproximado de las partículas fue de 14.4 mu. En el resto del citoplasma hay otras partículas disgregadas. X 80,000.

es rechazado hacia la periferia viéndose muy denso. Aparentemente disminuye de volumen al pasar parte de su material hacia el citoplasma, por lo tanto las membranas de la envoltura nuclear aparecen separadas en trechos. En esta etapa empiezan a aparecer los cristales virales en el citoplasma. Igualmente aparecen en esta etapa intermedia algunas masas densas posiblemente de origen ribonucleico que sirven de base para la formación de partículas virales.^{13, 14, 15, 16} Con frecuencia se pueden ver cisternas o vacuolas gigantes con material acuoso donde se pueden apreciar partículas virales libres.^{17, 18} (Graf. 3, Fig. 5, 6, 7 y 8). En la etapa final de la infección las células quedan transformadas en una esponja, con destrucción total de los organoides y cariólisis o cariorexis. En esta etapa es cuando se ve la mayor cantidad de cristales virales posiblemente como consecuencia de la conglomeración de partículas virales por el daño celular, o sea que, las células van liberando las partículas virales a medida que las forman, mientras el daño celular no sea notorio; en estado avanzado la liberación se dificulta quedando las partículas capturadas, las cuales tienden a agruparse formando cristales u otras agrupaciones, como rosetas e hileras^{12, 18} (Graf. 4, Fig. 9).

Los cristales virales están constituidos por hileras de partículas equidistantes. La distancia entre estas hileras varió de acuerdo al ángulo del corte dado al cristal pero éstas fueron 1.5 y 2.5 veces la distancia entre las partículas. El tamaño de la parte densa varió entre 14.5 a 22,5 $m\mu$ según el virus. La distancia tomada de centro a centro de partículas de 20 a 30 $m\mu$. En cristales formados por partículas equidistantes lo cual supone que el corte fue dado en un plano del cristal, se notaron que las partículas estaban dispuestas en un ángulo de 105° y 75° ^{12, 14} (Fig. 6, 7).

Además de los cristales, se apreciaron formaciones en rosetas, frecuentemente en células infectadas por Coxsackievirus. También algunas agrupaciones alargadas cuyas partículas guardan una misma disposición que en los cristales. Asimismo, se vieron largas hileras sencillas o dobles entre las vacuolas. Finalmente, partículas aisladas en el citoplasma o dispersas en cisternas fueron apreciadas^{12, 17, 18, 19}, (Fig. 8, 9).

En conclusión se puede interpretar que la formación de los enterovirus se efectúa en el citoplasma. Inicialmente hay un aumento de ARN nuclear el cual pasa al citoplasma dando como consecuencia una disminución del volumen nuclear. En el citoplasma aparecen estructuras similares al complejo de Golgi se vacuoliza profundamente como consecuencia del agotamiento del material celular. Las mitocondrias parecen no sufrir alteraciones morfológicas, aunque, desde luego, no se puede saber si hay alteraciones funcionales. Aparecen en el citoplasma grandes masas densas que aparentemente sirven de base para la formación de partículas virales. Aparecen también cuerpos espirales de significado patológico, pero de interpretación no conocida.^{12, 19} Alteraciones similares, tanto citoplasmática como nuclear han sido encontradas por infección de virus del grupo Col SK.^{20, 21}

Si comparamos ahora esta ultraestructura en células infectadas por otros virus podemos establecer algunas diferencias. Los reovirus aparentemente alteran menos el núcleo el cual permanece central. Las partículas son mayores en tamaño y se pueden observar también filamentos.^{22, 23, 24} Son citoplasmáticos. Los Arbovirus, también de multiplicación en el citoplasma, debido a su composición ARN. Se forman alrededor de vacuolas completando su estructura sobre las mismas. Por lo tanto, se pueden ver partículas alrededor y dentro de las vacuolas. El citoplasma se vacuoliza pero no se ha visto la formación esponjosa. Por el contrario, se observa gran cantidad de vesículas que forman parte de múltiples complejos de Golgi.^{22, 25, 26} Otros agentes como los adenovirus y herpesvirus, de composición ADN, se multiplican originalmente en el núcleo, dando, por lo tanto, un núcleo gigante con cuerpo de inclusión. Las partículas virales pasan al citoplasma donde completan sus estructuras externas, antes de ser liberadas. En el citoplasma se observan pocas estructuras patológicas.^{27, 33} Dentro de este último grupo también quedaría incluido el citomegalovirus.³⁴

Los mixovirus, como el influenzavirus, han sido observados sobre la membrana plasmática, donde aparentemente se forman.³¹ Virus mayores, como los Pox-virus, se multiplican en el citoplasma formando cuerpos de inclusión, donde se pueden apreciar fácilmente las grandes partículas virales que constituyen estos virus.^{27, 35, 36, 37} Finalmente, podemos decir algunas palabras sobre los virus neoplásicos cuyas partículas se dividen en cuatro tipos. El tipo más frecuente es el de partículas que se forman sobre las membranas citoplasmáticas.³⁸

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Melnick, J. L., Dalldorf, G., Enders, J. F., Gelfand, H. M., Hammon, W. McD., Huebner, R. J. and Rosen, L.: Classification of human enteroviruses. *Virology* 16, 501, 1962.
2. Vitelli-Flores, J. y Núñez-Montiel, O.: Aislamiento de los Enterovirus. *Pediatría (Chile)*: En imprenta.
3. Cramblett, H. F.: Infection with ECHO viruses and observed illnesses in human beings. *Postgraduated Med.* 25: 359, 1959.
4. Eichenwald, H. M. F., Abablo, A., Arky, A. M. and Hartman, A. P.: Epidemic diarrhea in premature and older infants caused by ECHO virus type 18. *J. A. M. A.* 166: 1563, 1958.
5. Melnick, J. L.: Advances in the study of enteroviruses. *Prog. Med. Virol.* 1: 59, 1958.
6. Melnick, J. L.: Enteroviruses. *Scient. Amer.* 200: 89, 1959.
7. O'Shaughnessey, W. J. and Buechner, H. A.: Hepatitis associated with a Coxsackie B5 virus infection during late pregnancy. *J. A. M. A.* 179: 71, 1962.

8. Syverton, J. T.: Enteroviruses. *Gastroenterology* 40: 331, 1961.
9. Melnick, J. L., Cockburn, W. C., Dalldorf, G., Gard, D., Gear, J. H. S., Hammon, W. McD., Kaplan, M. M., Nagler, F. P., Oker-Blom, N., Rhodes, A. J., Sabin A. B., Verlinde, J. D. and Von Magnus, H.: Picornavirus group. *Virology* 19: 114, 1963.
10. Jungeblut, C. W.: Columbia SK group of viruses. *Handb. Virusforsch.* 4: 459, 1958.
11. Sabin, A. B.: Reoviruses. *Science* 130: 1387, 1959.
12. Núñez-Montiel, O.: Ultraestructura de células cultivadas e infectadas con enterovirus. En imprenta.
13. Núñez-Montiel, O., and Weibel, J.: Electron microscope study of ECHO 19 virus infection in monkey kidney cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8: 291, 1960.
14. Núñez-Montiel, O., Weibel, J. and Vitelli-Flores, J.: Electron microscopic study of the cytopathology of ECHO virus infection in cultivated cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 457, 1961.
15. Rifkind, R. A., Godman, G. C., Howe, C., Morgan, C. and Rose, H. M. ECHO 9 virus in tissue culture observed by light and electron microscope. *Virology* 12: 331, 1960.
16. Rifkind, R. A., Godman, G. C., Howe, C. Morgan, C. and Rose, H. M.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. VI. ECHO virus type 9. *J. Exp. Med.* 114: 1, 1961.
17. Núñez-Montiel, O., Vitelli-Flores, J., and Weibel, J.: Finding of virus particles in cultivated monkey kidney cells infected with Coxsackie virus B5. *Virology* 14: 147, 1961.
18. Núñez-Montiel O.: Otras observaciones sobre células cultivadas de riñón de mono infectados con Coxsackie virus B5. *Citopatología. Acta Cient. Venez.* 12: 163, 1961.
19. Fogh, J.: Filamentous organization of polioviruses particles. *Virology* 14: 495, 1961.
20. Hinz, R. W., Barski, G. and Bernhard, W.: An electron microscopic study of the development of the encephalomyocarditis (EMC) virus propagated in vitro. *Exp. Cell Res.* 26: 571, 1962.
21. Nelson, E., Hager, H. and Kovács.: Ultrastructural alterations in neurons of mice infected with MM polioencephalitis virus. *Neurology* 11: 755, 1961.
22. Núñez-Montiel, O., Mussgay, M. y Weibel, J.: Citopatología de la infección con Reovirus y virus de la encefalitis equina venezolana en células cultivadas. Posible papel del complejo de Golgi en la formación viral. Estudio con el microscopio electrónico. *Rev. Latinoamer. Anat. Patol.* 6: 1, 1962.
23. Rhim, J. S., Jordan, L. E. and Mayor, H. D.: Cytochemical, fluorescent-antibody and electron microscopic studies on the growth of Reovirus (ECHO 10) in tissue culture. *Virology* 17: 342, 1962.
24. Tournier, P. et Plissier, M.: Le développement intracellulaire du Réovirus observé au microscope électronique. *Presse Méd.* 18: 683, 1960.

25. Mussgay, M. and Weibel, J.: Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan equine encephalitis virus in KB cells. *Virology* 16: 52, 1962.
 26. Morgan, C., Howe, C., and Rose, H. M.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Western equine encephalomyelitis virus. *J. Exp. Med.* 113: 219, 1961.
 27. Dales, S.: An electron microscope study of the early association between two mammalian viruses and their hosts. *J. Cell Biol.* 13: 303, 1962.
 28. Mayer, C., Ellison, S. A., Rose, H. M. and Moore, D. H.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. I. Herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* 100: 195, 1954.
 29. Morgan, C., Howe, C., Rose, H. M. and Moore, D. H.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. IV. Viruses of the RI-APC group. *J. Biochem. Cytol.* 2: 351, 1956.
 30. Morgan, C., Godman, G. C., Rose, H. M., Howe, C. and Huang, J. S.: Electron microscopic and histochemical studies of an unusual crystalline protein occurring in cells infected by type 5 adenovirus. Preliminary observations. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3: 505, 1957.
 31. Morgan, C., Rose, H. M.: Electron microscopic observations on the adenovirus and viruses of the influenza group. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 9: 256, 1959.
 32. Morgan, C., Rose, H. M., Holden, M. and Jones, E. P.: Electron microscopic observations on the development of Herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* 110: 643, 1959.
 33. Morgan, C., Godman, G. C., Breitenfeld, P. M. and Rose, H. M.: A correlative study by electron and light microscopy of the development of type 5 adenovirus. *J. Exp. Med.* 112: 373, 1960.
 34. Luse, S. A. and Smith, M. G.: Electron microscopy of salivary gland virus. *J. Exp. Med.* 107: 623, 1958.
 35. Higashi, N., Ozaki, Y., Notake, K., Ichimiya, M. and Fukada, T.: Virological and electron microscopic studies on the multiplication of poxvirus group in vitro. *Virus* 9: 165, 1959.
 36. Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M. and Moore, D. H.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. II. Vaccinia and fowl poxviruses. *J. Exp. Med.* 100: 301, 1954.
 37. Reczko, F.: Elektronmikroskopische untersuchung der mil originären schweinepochen infizierten bauchhaut des ferkels. *Arch. Virusforsch.* 9: 193, 1959.
 38. Bernhard, W.: The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Res.* 20: 712, 1960.
-

IGNACIO F. SEMMELWEIS

1818 - 1865

La vida y la obra de este investigador es dramática. Es notable, sin embargo, que su historia no sea de las más conocidas, inclusive entre los mismos médicos.

Asistente a la clínica ginecológica de Viena, le preocupaba la alta mortalidad por fiebre puerperal de entonces. La muerte de su íntimo amigo, el profesor de Medicina Legal, Kolletschka a consecuencia de un pinchazo en un dedo dado por un alumno durante la autopsia de una parturienta, le abrió luz para pensar que la fiebre puerperal era una infección de naturaleza general y no una epidemia desconocida, y que en su propagación intervenían los médicos y estudiantes que tenían frecuentes contactos con los cadáveres, ordenando que los médicos de su sala se lavaran las manos con cloro antes de intervenir en un parto y de esta manera inauguró la era de los antisépticos sin conocer las bacterias. El descubrimiento y comprobación de Semmelweis no tuvo la acogida que era de esperarse y su franqueza le acarreó el odio de colegas y poderosos.

Su abnegación, valor y confianza absoluta en lo que había descubierto lo hacen admirable ejemplo de hombre de ciencia.