

ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EXPERIMENTAL ESTUDIO HISTOLOGICO, HISTOQUIMICO Y ULTRAESTRUCTURA.

Jorge García Tamayo

Sección de Microscopía Electrónica. Instituto Anatomopatológico. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Apartado 50647, Sabana Grande, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Se presentan observaciones ultraestructurales sobre el desarrollo del virus de la encefalitis equina venezolana (EEV) en el cerebro de ratones lactantes que describen la manera como se forman los nucleocápsidos, su transformación en partículas virales por gemación en las membranas y la organización de la envoltura viral. Se discuten estos hallazgos y se comparan con los resultados del estudio del virus purificado, aislado, separando sus componentes estructurales con DOC y examinando las partículas en presencia de suero con anticuerpos, utilizando el método de tinción negativa.

Se discute la morfogénesis del virus de la EEV en el corazón, sistema nervioso, sistema reticuloendotelial, pulmón y el papel del endotelio como transportador de partículas virales. Se estudia la actividad de la fosfatasa ácida en el tejido nervioso y se hacen algunas consideraciones sobre los lisosomas y la respuesta tisular ante la agresión viral. Se comentan algunos hallazgos histoquímicos sobre la actividad de la ATPasa.

Se estudia con el microscopio de luz el bazo y el cerebro de ratas inoculadas por la vía ip con el virus de la EEV y se discuten las alteraciones observadas relacionadas con la respuesta celular de las ratas ante la infección viral. Se estudia con el microscopio de luz y electrónico el sistema nervioso de ratas sobrevivientes a la infección con el virus de la EEV y se demuestran alteraciones que se consideran secuelas neuropatológicas de la infección. Se discuten estos hallazgos en base a los conocimientos actuales sobre secuelas neurológicas en humanos, después de la infección con el virus de la encefalitis equina venezolana.

Se examina histológicamente el sistema nervioso central de ratas inoculadas ip con el virus de la EEV y otras utilizadas como control, en las cuales se observaron evidencias histológicas de toxoplasmosis cerebral. Se señala el efecto del virus y de los mecanismos inmunológicos en la reactivación experimental de esta enfermedad en la rata.

Se examina histológicamente y por titulación de virus, la placenta, embriones y fetos de ratas inoculadas ip con el virus de la EEV, durante la primera, segunda y tercera semana de gestación. Se demuestra multiplicación del virus en la placenta. Durante las dos primeras semanas se produce muerte y reabsorción de los embriones. Las alteraciones durante la tercera semana examinadas entre el 2do y 4to día post inoculación se localizan inicialmente en los vasos miometriales y luego deciduales con severas lesiones de la placenta y del feto. Estas alteraciones sugieren un mecanismo patogénético similar al descrito con el virus de la rubeola.

INTRODUCCION

En Venezuela se han descrito brotes epizooticos entre mulas, burros y caballos desde el año 1930⁽¹¹⁾. En 1939, Kubes y Ríos⁽⁹¹⁾ aislaron el agente causal de estas epizootias y lo llamaron el virus de la encefalitis equina venezolana. Durante el año 1954 se produjo un grave brote de encefalitis equina venezolana (EEV) en Colombia⁽¹³¹⁾, describiéndose casos en equinos y en humanos. En 1959 se describieron casos de encefalitis en Maracaibo⁽¹¹³⁾, y en el mes de octubre de 1962 se desató un grave brote epidémico, precedido por una epizootia de equinos en la región de

la Guajira venezolana; se reportaron mas de 30.000 casos de encefalitis con 190 muertes, y la enfermedad se diseminó por toda la península de la Guajira en la frontera colombo-venezolana⁽²⁷⁾. En 1968⁽¹⁴¹⁾ y en 1969⁽¹³⁰⁾, la EEV provocó epizootias y epidemias en la Guajira, en Maracaibo, y en otras áreas del Estado Zulia, extendiéndose la enfermedad hacia las costas del Estado Falcón.

Desde el año 1962 se estudia la ecología de las planicies y manglares en la vecindad de Sinamaica, pueblo ubicado en la península de la Guajira venezolana. Se ha practicado el aislamiento de virus a partir de ratones y hamsters centinelas, se investigan los vectores y se examinan muestras de sangre de humanos y animales selváticos y domésticos para detectar anticuerpos. Estas investigaciones han sido reportadas por S. Ryder en 1972⁽¹²⁹⁾, y sin duda contribuyen a dilucidar algunos factores que inciden sobre la epidemiología de la EEV en el occidente del país. A pesar de la importancia que para Venezuela tiene la EEV, los trabajos reportados sobre la patología de esta enfermedad son escasos.

Estudios experimentales realizados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Hospital General del Sur de Maracaibo, demostraron por primera vez la manera como el virus de la EEV se desarrolla en el sistema nervioso de un ser vivo^(47, 48). Posteriormente fué demostrado como el virus puede desarrollarse en el corazón y como él es capaz de atravesar el endotelio vascular en vesículas de pinocitosis⁽⁵¹⁾. Hemos descrito también algunas investigaciones sobre la morfología de las partículas virales en cortes finos y purificando el virus a partir de cerebro de ratón lactante⁽⁴⁹⁾, así como aspectos ultraestructurales sobre el virus de la EEV disecando los componentes de la partícula viral y examinándolos con tinción negativa⁽⁵³⁾. Estos trabajos y los reportes de Domínguez⁽³⁷⁾ y Wenger^(155, 156, 157) sobre el efecto del virus de la EEV en humanos, son los únicos estudios morfológicos que sobre el virus de la EEV existen en nuestro país.

El objeto de este trabajo es presentar algunas evidencias adicionales sobre el desarrollo del virus de la EEV en el tejido nervioso de ratones recién nacidos, particularmente en relación con la actividad de la enzima fosfatasa ácida y señalar algunas características de las partículas virales aisladas del cerebro de los ratones lactantes.

Por otra parte presentamos observaciones histológicas sobre el efecto del virus de la EEV en ratas, examinando el tejido nervioso y linfoide durante la fase aguda de la infección. Este modelo experimental está actualmente siendo examinado a nivel del microscopio electrónico. Finalmente reportamos las observaciones sobre las secuelas que el virus provoca en el sistema nervioso de las ratas sobrevivientes varios meses después de la in-

fección aguda. La importancia de estos hallazgos es mayor por cuanto estamos conscientes de que la morbilidad durante las epidemias de EEV es muy elevada y se están produciendo reportes sobre alteraciones de las funciones cerebrales, convulsiones y mayor incidencia de epilepsia en niños que han padecido previamente encefalitis, causada por el virus de la EEV (27, 95).

Utilizamos parte de un lote de ratas Sprague-Dawley que presentaban evidencias morfológicas de toxoplasmosis cerebral para comparar los cambios histológicos inducidos por el virus de la EEV en estos animales con los descritos en la fase aguda de la infección. La importancia que tiene el demostrar una reactivación de la toxoplasmosis cerebral en estos animales, está expresada en la discusión de aspectos inmunológicos cuyo valor real en ambas infecciones no están claramente establecidos (41, 42).

Finalmente desarrollamos un modelo experimental para examinar la patogenia de la infección intrauterina inducida por el virus de la EEV en ratas. El estudio histológico y virológico de los embriones, fetos y placentas debe contribuir a determinar aspectos de la patogenia de ésta y otras enfermedades virales que inducen alteraciones intrauterinas en el humano. La comparación entre los mecanismos patogenéticos en rubeola y en la infección con el virus de la EEV será de gran valor por pertenecer ambos al grupo de los togavirus los cuales han sido implicados en la producción de lesiones intrauterinas en humanos y en animales.

MATERIAL Y METODOS

1. Experimentos en ratones recién nacidos

1.1.— **Virus y animales.** Se utilizaron 18 ratones albinos suizos (colonia del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), original de NMR Bethesda, Navy Medical Research). Se inocularon intracerebralmente 14 ratones con 0.02 ml de una suspensión de virus de la EEV, cepa Guajira, con un título de 10^{-9} DL50 por 15,9 ml, y se utilizaron 4 ratones como controles. Cinco ratones fueron decapitados entre 16 y 24 horas después de la inoculación, y los restantes animales se sacrificaron entre 30 y 48 horas después de la inoculación. En esta etapa la parálisis del tren posterior era evidente.

1.2.— **Histología y estructura.** Se tomaron muestras del cerebro para su estudio histológico rutinario, fijándolas en formol al 10% y procesándolas de acuerdo con métodos convencionales de inclusión en parafina y coloraciones de rutina (H&E) y especiales para sistema nervioso. Para el estudio con el microscopio electrónico, se cortaron pequeños fragmentos de cere-

bro, bazo, pulmones, hígado y corazón con una hojilla nueva en trozos de unos 2 a 3 mm y se fijaron inmediatamente en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato de sodio, pH 7.2 a 4°C. La fijación se mantuvo por períodos variables, entre 3 y 24 horas, sin modificaciones apreciables en la estructura. Los fragmentos se lavaron en la solución de buffer fosfato de sodio a 4°C durante 24 horas y se fijó nuevamente el material, esta vez con tetraóxido de osmio al 2% en solución de buffer fosfato, durante dos horas. El material se deshidrató luego en concentraciones crecientes de acetona y se incluyó en Araldita, polimerizándose a 60°C durante 48 horas. Los cortes de una micra y las secciones ultrafinas se hicieron en un ultramicrotomo Porter Blum MT2 equipado con una cuchilla de diamante. Para su observación con el microscopio de luz se tiñeron con azul de Toluidina y Safranina, y para su estudio con el microscopio electrónico se colocaron en rejillas de cobre o níquel y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

1.3.— **Actividad de la fosfatasa ácida.** Para investigar la actividad de la enzima fosfatasa ácida, se utilizó el método de Gomori. Pequeños fragmentos de tejido se fijaron en glutaraldehído al 6,25% en una solución 0,068 M de buffer cacodilato de sodio a pH 7.2 y a 4°C. Después de 15 ó 30 minutos de fijación, el material se lavó en una solución 0,1 M de cacodilato de sodio fría, con 7,5 gr de sacarosa por ml, y los fragmentos se llevaron al criostato para hacer cortes congelados de aproximadamente 4 micras de espesor. Estos cortes se hicieron flotar en una solución de buffer cacodilato a 4°C y se transfirieron al medio de Gomori recién preparado, con beta glicerofosfato de sodio al 20%, acetato de plomo y solución reguladora de acetato de plomo 0,1 M y a pH 5.2. Muestras para el control se incubaron en un medio de Gomori preparado sin el sustrato beta glicerofosfato de sodio. Después de la incubación el material se lavó en buffer acetato 0,1 M pH 5.2 por un minuto antes de ser tratada brevemente con ácido acético al 2%. Pevio lavado en la solución de buffer acetato se fijó de nuevo el material, ahora en tetraóxido de osmio al 2% en buffer fosfato y se deshidrató e incluyó de acuerdo con los detalles técnicos señalados previamente (1.2).

1.4.— **Separación de los componentes estructurales del virus de la EEV.**

a) **Purificación.** Se inocularon 10 ratones albinos suizos lactantes, por vía intracerebral, con una suspensión (DL50) de la cepa Guajira del virus de la EEV. Los animales fueron sacrificados al presentar signos de enfermedad y sus cerebros colectados en forma aséptica. Se preparó una suspensión 1:5 con buffer que contenía 0,02 M Tris (tris-hidroximetil-amino-metano), 5×10^{-4} EDTA (ácido etilendiamino tetracético) y 0,1 M NaCl (tris-salina), ajustando a pH 8.5 con la adición de HCl y se homo-

geneizó con los cerebros en frío en un Potter-Elvehjem. Se clarificó por doble centrifugación, la primera a 1.400 g por minuto y la segunda a 7.000 g por 20 minutos. El sobrenadante se llevó en frío a una saturación de 50% con sulfato de amonio. El precipitado se colectó por centrifugación a 26.400 g y se suspendió en tris-salina, dializándolo luego contra borato salino pH 9.0 durante toda la noche a 0°C.

El dializado se colocó en el tope de un gradiente lineal de sacarosa (15-30%) en buffer tris-salino en tubos lusteroides y se centrifugó en el rotor SW 25.1 en una ultracentrífuga Spinco modelo L a 41.400 g por 5 horas a 4°C. Las fracciones se recogieron a través de un agujero en el fondo del tubo, se leyeron en un espectrofotómetro Zeiss PMZ II a 260 y 280 nm. Se reunieron las fracciones que presentaban mayor actividad aglutinante y se concentraron por centrifugación a 100.000 g por 1 hora. El precipitado fué suspendido en tris-salina.

Parte de este material se colocó en el tope de un nuevo gradiente lineal de sacarosa (5-30%) en tris-salina y se centrifugó en el rotor SW 50L a 51.000 g por 2 horas. A las fracciones recogidas a través de un agujero en el fondo del tubo se les determinó su absorción a 260 y 280 nm y se les practicó la prueba de hemaglutinación. Se combinaron en un solo tubo aquellas fracciones que presentaban mayor actividad aglutinante y se concentraron por centrifugación a 100.000 g por 1 hora. El precipitado final fué suspendido en tris-salina y constituye el virus purificado.

b) **Tratamiento con desoxicolato de sodio.** Los precipitados obtenidos a partir de los gradientes de sacarosa fueron tratados con partes iguales de desoxicolato de sodio (DOC) en tris-salina (concentración final 0,2%), por una hora a temperatura ambiente y luego fraccionados en gradientes de sacarosa (5-30%) que contenían 0,2% de DOC. Se centrifugaron en el rotor SW 50L a 51.000 g por 2 horas. A las fracciones recogidas se les determinó absorción a 260 y 280 nm y se les practicó la prueba de hemaglutinación. Se combinaron, por un lado, los tubos del fondo del gradiente que presentaron mayor absorción y por otro, los del tope del gradiente con mayor actividad hemaglutinante. Se concentraron por centrifugación a 100.000 g por 1 hora y los precipitados se suspendieron en tris-salina.

c) **Microscopía electrónica (ME).** Muestras de las diferentes fracciones aisladas se tiñeron con una solución saturada de acetato de uranilo o fueron mezcladas a partes iguales con ácido fosfotúngstico a pH 6.0 y aplicados sobre rejillas de cobre o níquel cubiertas de película de soporte. El exceso de líquido se eliminó con papel de filtro y se observaron en un

microscopio electrónico JEM 7A con aumento directo variable entre 8.000 y 65.000 utilizando un voltaje acelerador de 80 KV.

1.5.— **Estudio con tinción negativa de las partículas del virus de la EEV en presencia de suero con anticuerpos anti EEV.** Para la purificación del virus se utilizó el procedimiento señalado antes (1.4.a). Utilizando diluciones diferentes se puso en contacto el virus de la EEV con suero de ratón y de cobayo con títulos de anticuerpos anti-EEV conocido. Las muestras se incubaron a 37°C por una hora. Se colocó una gota de la muestra en rejillas de cobre y de níquel preparadas con película de soporte y carbón y se tiñeron con solución saturada de acetato de uranilo, de acuerdo al procedimiento referido en la parte 1.4.c.

2. Experimentos en ratas: infección aguda.

2.1.— **Virus y animales.** Sesenta y cinco ratas machos Sprague-Dawley, de aproximadamente 100 días de edad, fueron utilizadas en este experimento. Veinte ratas fueron inoculadas intraperitonealmente (ip) con una dosis de 200 ufp del virus de la EEV, cepa Guajira (IVIC), y se sacrificaron por decapitación en parejas, diariamente, durante los 10 primeros días después de la inoculación. Estos animales se utilizaron para estudiar la curva de viremia en sangre y titular virus en el sistema nervioso y en el bazo. Treinta ratas se inocularon ip con 200 ufp del virus de la EEV y se sacrificaron por decapitación cinco animales, los días 3, 4, 6, 7, 8 y 10 después de la inoculación. A partir del cuarto día las ratas mostraban irritabilidad, fiebre, pelo erizado, y algunas eran menos activas que los animales controles. Entre el 6o. y 8o. día la mayoría de las ratas presentaban un estado de postración grave, algunas de ellas con evidente parálisis del tren posterior. Como control del experimento se utilizaron 15 ratas Sprague-Dawley, machos, de edad similar a las ratas inoculadas y se sacrificaron paralelamente a los animales inoculados siguiéndose los mismos procedimientos para su estudio.

2.2.— **Histología y ultraestructura.** Después de una breve anestesia con éter, las ratas fueron decapitadas y se extrajo cuidadosamente el cerebro. Se tomaron pequeños fragmentos de corteza cerebral, núcleos grises de la base, mesencéfalo y cerebelo; se cortaron con hojilla nueva mientras se fijaban en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato a pH 7.2 a 4°C. Igual procedimiento se practicó con el bazo, y tanto el cerebro como el bazo no utilizados para el estudio ultraestructural, fueron fijados en formol al 10% para estudio histológico convencional. Los fragmentos de cerebro y bazo fijados en glutaraldehído, fueron lavados en buffer fosfato a 4°C y fijados nuevamente en tetraóxido de osmio al 2% durante dos horas. Posteriormente se deshidrataron en alcoholes a concentraciones crecientes y

se incluyeron en Araldita polimerizándose en la estufa a 60°C durante 24 horas. Se practicaron cortes de una micra de espesor del material incluido en Araldita y se tiñeron con azul de Toluidina para su examen con el microscopio de luz. Para su estudio con el microscopio electrónico, se practicaron cortes ultrafinos en un ultramicrotomo Reichert equipado con cuchilla de diamante, se colocaron en rejillas de cobre o de níquel y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss 9A. El material del cerebro y bazo fijado en formol al 10% fué incluido en parafina y se practicaron cortes en un microtomo de deslizamiento que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. En algunos cortes se practicaron tinciones de PAS, tricrómico, reticulina, Holzer y Bodian.

3. Experimentos en ratas: sobrevivientes.

3.1.— **Virus y animales.** Cincuenta ratas macho, Sprague-Dawley, de aproximadamente 100 días de edad fueron utilizadas en este experimento. Diez de ellas no fueron inoculadas con el virus y se utilizaron como controles, sacrificándolas al unísono con los demás animales. Se inocularon ip 40 ratas, con 200 ufp de virus de la EEV, cepa Guajira, y se observó cuidadosamente su evolución clínica. Cada animal fué evaluado desde el punto de vista de sus manifestaciones de fiebre, irritabilidad, grado de decaimiento y parálisis. Se adoptaron cuidados especiales para las ratas inoculadas, ubicándolas en un cuarto oscuro, con un mínimo de ruidos; en muchas de ellas fué necesario hidratarlas y alimentarlas oralmente en la fase crítica de la infección entre los días 6o. y 12o. A pesar de estas precauciones, 25 animales murieron entre el primer y 15o. día de la inoculación y sus cerebros y vísceras fueron fijados en formol al 10% para su estudio histológico. Las 15 ratas que sobrevivieron a la infección se mostraron recuperadas entre los días 16 y 22 después de la inoculación. A los 22 días no habían signos de parálisis y la recuperación clínica de los animales era aparentemente ad-integrum. Cinco de estos animales fueron sacrificados un mes después de la inoculación. Las 8 ratas sobrevivientes a la infección con el virus de la EEV fueron sacrificadas tres meses después de la inoculación. Entre el primer y tercer mes murieron dos ratas presentando ambas meningitis purulenta, en una de ellas con abscesos cerebrales. Estos animales no se consideraron entre las ratas sobrevivientes de este estudio. La metodología utilizada fué semejante a la señalada en la sección 2.2. de este trabajo, concentrándose el estudio histológico y ultraestructural en el sistema nervioso.

4. Experimentos en ratas: efecto del virus de la EEV sobre la toxoplasmosis cerebral.

4.1.— **Virus y animales.** Los animales utilizados en este experimento

fueron 30 ratas Sprague-Dawley, obtenidas de un bioterio local, y consideradas como "sanas". La mayoría de los animales fueron machos, con una edad aproximada de 100 días. Veintiseis ratas fueron inoculadas intraperitonealmente con 200 unidades formadoras de placas (UFP) del virus de la EEV sacrificadas por decapitación a diferentes días post-inoculación (4, 6, 8, 12, 15 y un mes). De cada animal se tomaron muestras de sangre y de tejido nervioso, para titulación de virus. Después de sacrificar los animales por decapitación, se extrajo el cerebro y cerebelo cuidadosamente y se colocaron en un recipiente con formol al 10%. Posteriormente se practicaron cortes sagitales en sentido anteroposterior y se procesó el tejido para estudio histológico; deshidratación en alcoholes, inclusión en parafina, cortes en microtomo de deslizamiento y preparación de cortes seriados en láminas teñidas con hematoxilina-eosina. Algunos cortes se tiñeron con Bodian, PAS, Giemsa, Tricrómico de Masson y Kluver. Los cortes se examinaron con el microscopio de luz. Ocho ratas no fueron inoculadas con el virus de la EEV y se utilizaron como control. Estos animales se sacrificaron en diversos días post-inoculación (4, 6, 8, 12, 15 y un mes) el material proveniente de estas ratas fué procesado de manera semejante a la señalada previamente.

5. Patogenia de la infección intrauterina.

5.1.— **Virus.** La cepa del virus utilizada en este estudio fué originalmente aislada en 1962 del suero de un paciente durante la epidemia de EEV en la Guajira (cepa Guajira IVIC-SH 11.75) (17, 135). El virus se utilizó después de dos pasajes en células BKH-21, seguidos por tres pasajes en cerebro de ratón lactante. El lote de virus fué preparado en células Vero y los títulos de infectividad se calcularon por el método de placas utilizando una capa de agarosa libre de suero (17).

5.2.— **Animales y diseño experimental.** En este experimento se utilizaron ratas Sprague-Dawley de aproximadamente 100 días de edad. Los animales se inocularon intraperitonealmente con 200 unidades formadoras de placas. La fecha de gestación fué precisada por apareamiento durante el estro y examen microscópico del contenido vaginal. Las ratas preñadas fueron inoculadas ip con 200 ufp durante la primera, segunda y tercera semana de gestación. Las inoculaciones se hicieron los días 5, 12, 15, 18 y 20 de gestación y los animales se sacrificaron al segundo, tercer y cuarto día post-inoculación. Algunos animales de 18 y 20 días de gestación fueron inoculados con 2000 ufp. A las ratas anestesiadas brevemente con cloroformo o éter y se les practicó una incisión abdominal extrayéndose los fetos y las placentas. Para el estudio virológico se congelaron inmediatamente algunos fetos con sus respectivas placentas, otros fueron fijados en formol al 10% para su estudio histológico.

RESULTADOS

1. Experimentos en ratones.

1.1.— Ultraestructura.

a) **Desarrollo del virus de la EEV en el cerebro.** En los ratones sacrificados entre 24 y 48 horas después de la inoculación intracerebral con el virus de la EEV, se observaron una serie de cambios en las neuronas y en las células gliales que han sido descritas previamente (47, 48), por lo que los señalaremos brevemente. Se observó hinchamiento de los astrocitos y aumento de las partículas de glicógeno beta en su citoplasma. Las neuronas presentaron disminución y dispersión de los polirribosomas y algunos de ellos se disponían en forma helicoidal. El aparato de Golgi proliferó en número y sus cisternas se hicieron abundantes con frecuentes vesículas y vacuolas (Fig. 1a); algunas cisternas adoptaron forma circular y a las 48 horas después de la inoculación era evidente que partículas de 28 a 30 nm de diámetro, redondas, estaban adheridas a las membranas de las cisternas y vesículas del aparato de Golgi (Fig. 1b). Con frecuencia las mitocondrias se presentaron hinchadas, con ruptura y vesiculización de sus crestas y figuras mielínicas en su interior. Se vieron terminales sinápticos hinchados o con dilatación de sus vesículas. Algunas neuronas mostraron aumento de la densidad electrónica o áreas con aspecto de cromatina y abundantes ribosomas agrupados en el citoplasma. Los nucleocápsidos medían de 28 a 30 nm, eran partículas redondas con límites de apariencia finamente irregular, con un moteado osmofílico conformando su estructura (Fig. 2a). En los ratones sacrificados entre 30 y 48 horas después de la inoculación se vieron masas de material granular, más fino y de menor tamaño que los ribosomas (Fig. 2b) agrupados en el citoplasma en forma de áreas redondeadas que con frecuencia mostraban en su periferia nucleocápsidos (NC) de 28 a 30 nm y que en ocasiones parecían formarse por condensación del material granular descrito (Figs. 3a, 3b, 3c). Los NC se vieron libres en el citoplasma o adheridos a las membranas de las cisternas del aparato de Golgi o a sus vesículas y vacuolas citoplasmáticas incorporando la membrana alrededor de ellos por un mecanismo semejante a la gemación de manera que al rodearse de la membrana, estas estructuras forman las partículas virales de 45 nm de diámetro. También se observó gemación en la membrana plasmática de las células nerviosas y salida de las partículas de 45 nm al espacio intercelular. Las partículas de 45 nm mostraron una cubierta de unos 10 nm de espesor con presencia de espículas en su superficie, no siempre muy evidentes, de 5 a 10 nm de longitud y las cuales eran fácilmente visibles cuando los virus se encontraban en el espacio extracelular (Fig. 4). En los espacios periaxónicos, las partículas virales se agrupaban con frecuencia en forma paracristalina, uniéndose entre ellas por sus finas espículas, en forma de malla linealmente (Figs. 5a,

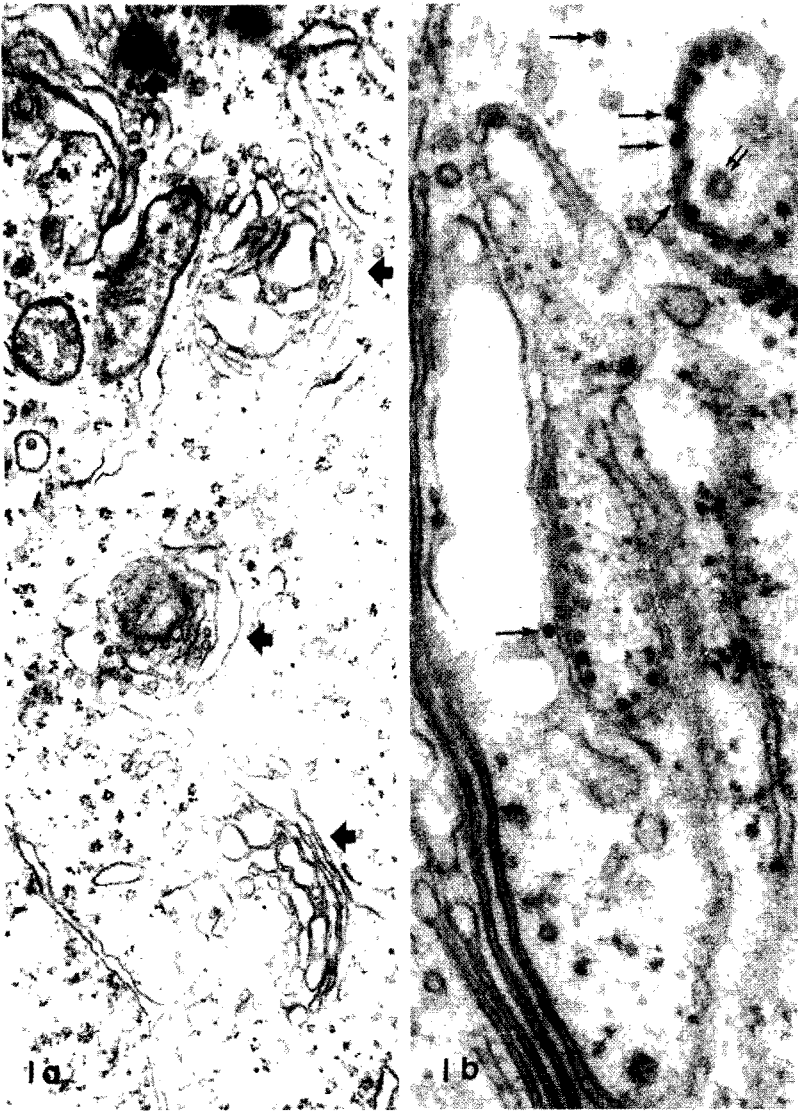


Fig. 1.— Cerebro de ratón recién nacido 24 horas post inoculación intracerebral con virus de la EEV, cepa Guajira. a) Proliferación de los aparatos de Golgi en el citoplasma de una neurona (flechas) 27.000 X. b) Aparato de Golgi con cisternas tubulares a cuya membrana se adhieren nucleocápsidos (flechas). La doble flecha señala una vesícula golgiana de contenido proteico que se reconoce por las proyecciones espiculares periféricas. No debe confundirse con una partícula viral. 60.000 X.

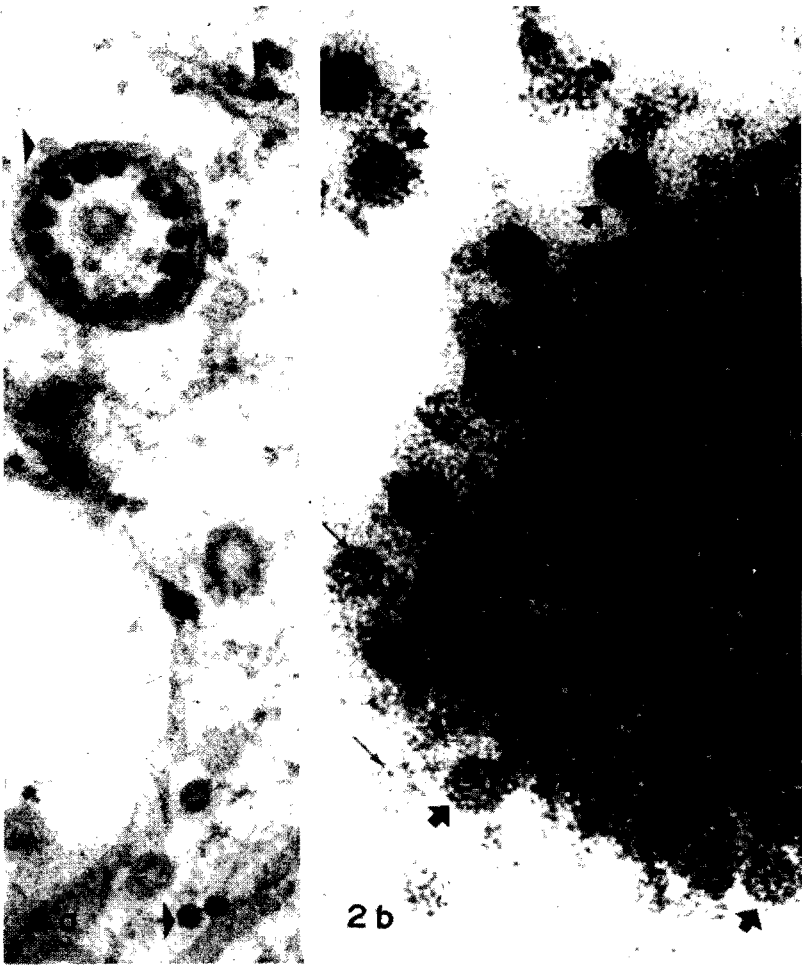


Fig. 2.— a) Cisterna circular con nucleocápsidos adheridos a la membrana y libres en el citoplasma (cabezas de flechas). 106.250 X. b) Area de viroplasma y nucleocápsidos. Las flechas gruesas señalan algunos nucleocápsidos en los cuales se ven subunidades que les dan una apariencia moteada. Las flechas simples señalan a estas subunidades destacando su forma circular que mide aproximadamente 8 nm de diámetro. 255.625 X.

5b). Ocasionalmente se vieron partículas virales en el axoplasma (Fig. 5a). La membrana plasmática de algunas neuronas mostró en algunas células protusiones vesiculares en su superficie; éstas no parecían tener relación con la gemación de las partículas virales (Fig. 6). En la luz de los vasos sanguíneos se vieron partículas virales en las cuales eran también muy evidente las espículas de su envoltura (Fig. 7).

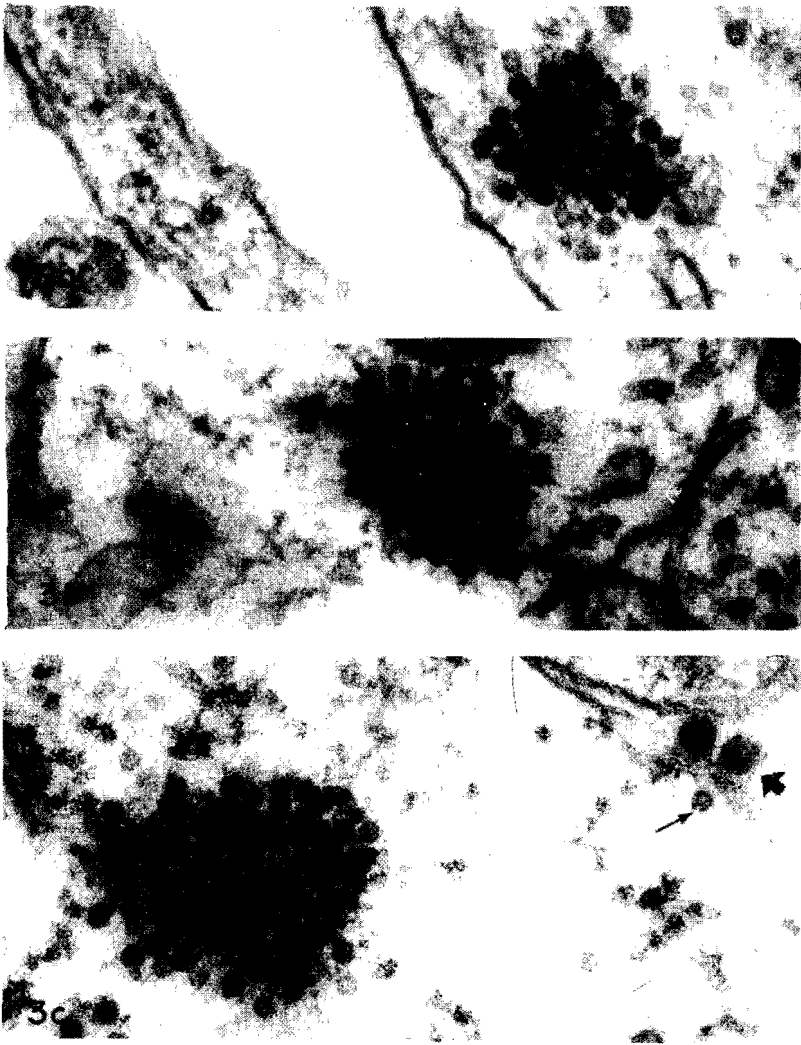


Fig. 3.— a, b, c. Se muestran diversos estadios en la formación de los nucleocápsidos alrededor de las áreas de viròplasma. En la figura 3c, la flecha simple señala un nucleocápsido y la gruesa dos partículas en la fase final del fenómeno de gemación. 106.250 X.

b) **Replicación del virus en el miocardio.** Algunas fibras miocárdicas mostraron hinchamiento del sarcoplasma y disminución de la densidad electrónica del mismo con desorganización y disminución de las miofibrillas, en otras el sarcoplasma estaba vacuolizado con dilatación de las cisternas del retículo sarcoplasmático o formando vacuolas debajo del sarcolema. Se vieron polisomas con organización helicoidal. En el sarcoplasma



Fig. 4.—Partículas del virus de la EEV con espículas en su envoltura. Los viriones han sido señalados con números para su identificación. PV1: en la vecindad de la membrana plasmática señalada por la flecha gruesa. Las flechas simples señalan 12 proyecciones espiculares superficiales, algunas mas prominentes que otras. PV2: partícula viral que presenta la apariencia de una estrella por un fenómeno de rotación a la derecha y en la cual son evidentes 6 espículas más prominentes que han sido señaladas con las cabezas de flechas. 250.000 X.

se vieron NC, algunas veces alrededor de masas de material granular dando la impresión de formarse por fusión de estas áreas electrodensas y granulares. Los NC se vieron haciendo gemación en el sarcolema e incorporando la membrana para transformarse en partículas de 45 nm con las características señaladas previamente (Fig. 8). Se observó también gemación de las partículas virales en las cisternas del retículo sarcoplasmático y en vesículas y vacuolas que se originaban del aparato de Golgi (Fig. 9). En el espacio intercelular (Figs. 10a y 10b) entre las fibras miocárdicas o entre los vasos sanguíneos y el tejido conectivo subyacente se vieron partículas virales. Las células del tejido conjuntivo, fibroblastos e histiocitos que se observaron en la vecindad del miocardio también mostraron NC en su citoplasma y partículas virales en sus vacuolas o naciendo por gemación en su membrana plasmática.

c) **Leucocitos, macrófagos y virus.** En los ratones recién nacidos inoculados con el virus de la EEV se observó con el microscopio electrónico un incremento de la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares; ésto fué particularmente observado a nivel de los sinusoides

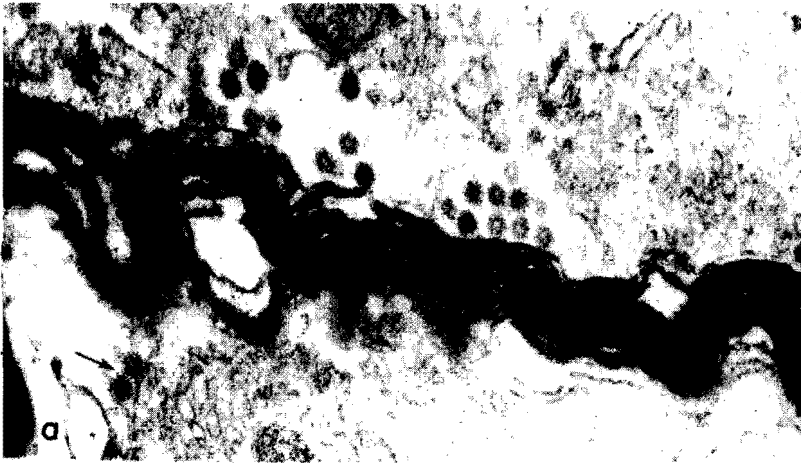


Fig. 5.— a) Partículas virales en el espacio periaxónico unidas por sus espículas muy simétricamente. La flecha señala dos viriones en el axoplasma. 60.000 X. b) Agrupación lineal de partículas del virus de la EEV en los espacios intercelulares del tejido nervioso. Nótese la unión a través de sus espículas. 106.250 X.

hepáticos y en las células de Kupffer (Figs. 11a y 11b). Las vacuolas en el citoplasma de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) mostraban en ocasiones apariencia vacía y sus contornos no estaban siempre limitados por una membrana (Fig. 12). Otras veces las vacuolas contenían material de densidad electrónica baja, con aspecto de lípidos y en ocasiones figuras mielínicas. Algunos leucocitos PMN presentaban grandes vacuolas fagocíticas conteniendo restos celulares de aspecto granular, este tipo de vacuolas eran más frecuentes a nivel del hígado. Los linfocitos y monocitos se examinaron solamente en los espacios vasculares. No se observaron modificaciones en los pequeños linfocitos y algunos monocitos presentaron vacuolas en su citoplasma, muchas veces sin límites precisos dando la impresión

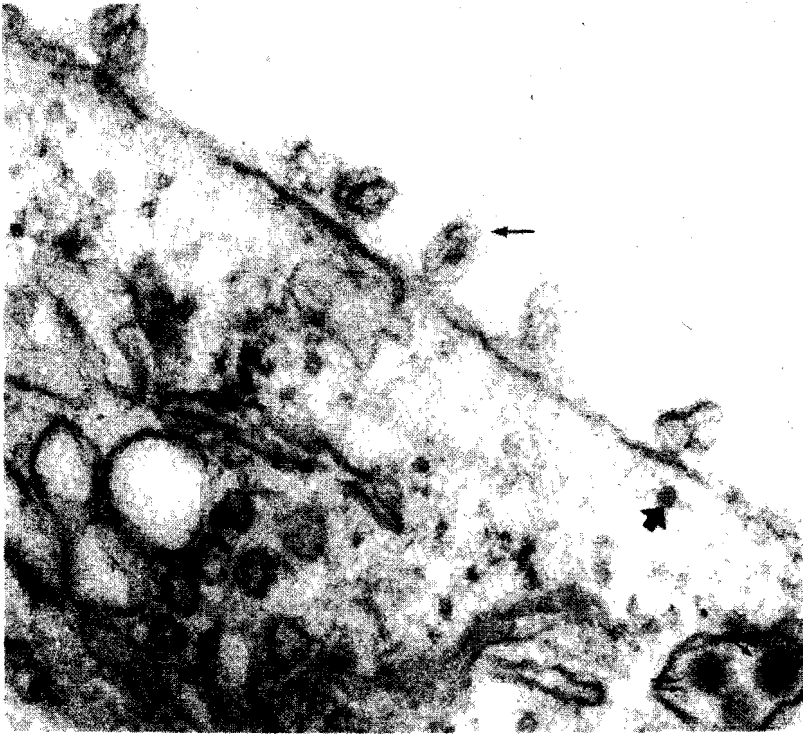


Fig. 6.— Vesículas en la membrana plasmática de una neurona (flecha simple) que muestra nucleocápsido (flecha gruesa) cerca de las cisternas y vesículas del aparato de Golgi y de la membrana plasmática. Las flechas dobles señalan partículas virales dentro de una vacuola. 106.250 X.

de ser áreas de rarefacción del citoplasma donde ocasionalmente se vieron partículas virales (Fig. 13). En la periferia de los monocitos fué posible evidenciar partículas virales asociadas a la membrana plasmática (Fig. 13). Los macrófagos libres o células mononucleares fagocíticas no son reportadas puesto que se encontraban en áreas de inflamación o necrosis y tanto ellos como los leucocitos PMN mostraban signos evidentes de fagocitosis. Las células de Kupffer del hígado y las células reticulares que limitan los sinusoides esplénicos fueron examinadas y las denominaremos macrófagos del sistema reticuloendotelial. En las células de Kupffer la vacuolización del citoplasma fué muy marcada; en las vacuolas y adosadas a la membrana plasmática se vieron frecuentes partículas virales. Las células reticulares del bazo mostraban signos evidentes de replicación viral con abundantes NC en su citoplasma, y adheridos a las cisternas y vesículas o vacuolas, algunas de las cuales contenían material granular de aspecto fagocítico y con frecuencia se vió la apertura de vesículas densas con aspecto de lisosomas en la luz de las vacuolas fagocíticas (Fig. 14). Algunas vacuolas

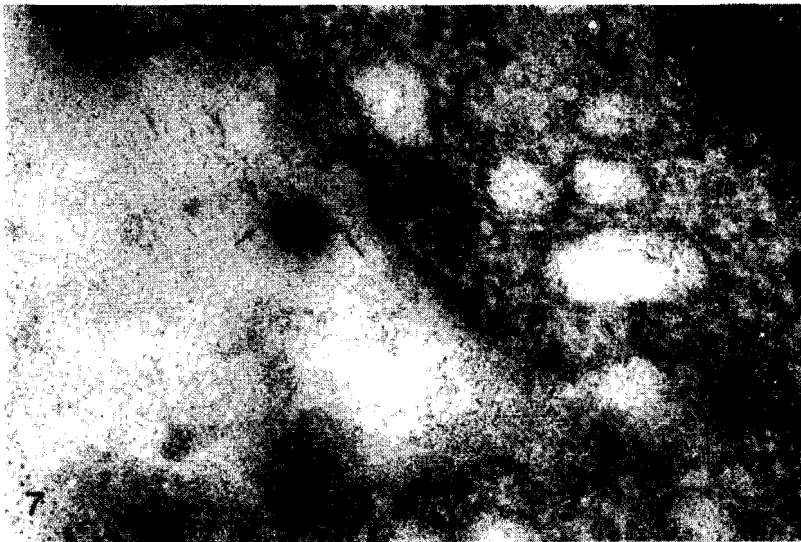


Fig. 7.— Virus de la EEV en la luz de un vaso sanguíneo y cercano al endotelio que muestra vesículas de pinocitosis. Las flechas señalan las espículas en la envoltura viral. 162.500 X.

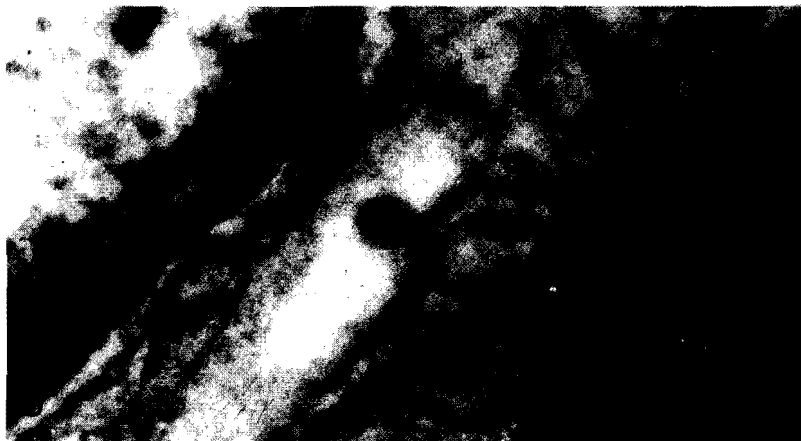


Fig. 8.— Gemación de una partícula del virus de la EEV a nivel del sarcolema. Nótese el contacto con la membrana plasmática y en el extremo opuesto de la partícula la presencia de espículas. 106.250 X.

mostraron vesículas pequeñas e irregulares formadas por membranas que parecían agruparse alrededor de las vacuolas en espacios irregulares abiertos en el citoplasma de los macrófagos (Fig. 15). En los macrófagos fijos e histiocitos tisulares y en algunos fibroblastos se vieron NC en el citoplasma y gemación de estas partículas precursoras en la membrana plasmática con formación de partículas virales (Fig. 16).

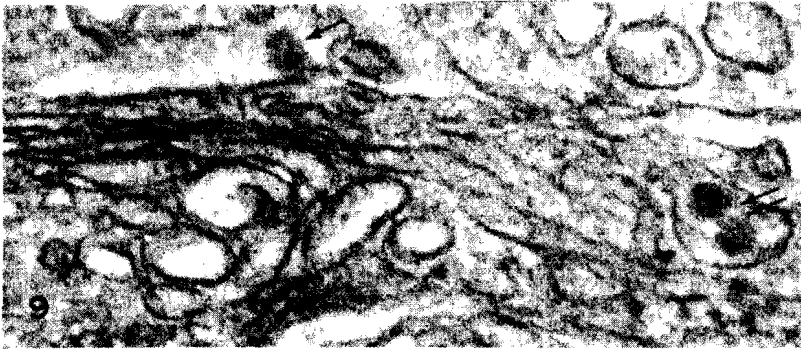


Fig. 9.— Hipertrofia del aparato de Golgi en la fibra miocárdica. Se ve una partícula en la fase de gemación (flecha simple) y dos de ellas dentro de vesículas citoplasmáticas (flechas dobles). 106.250 X.

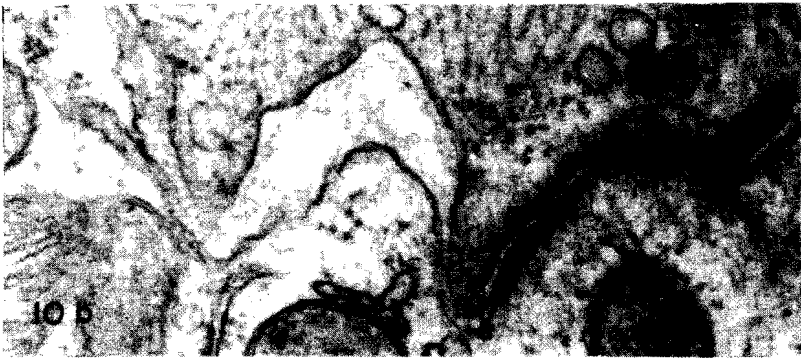
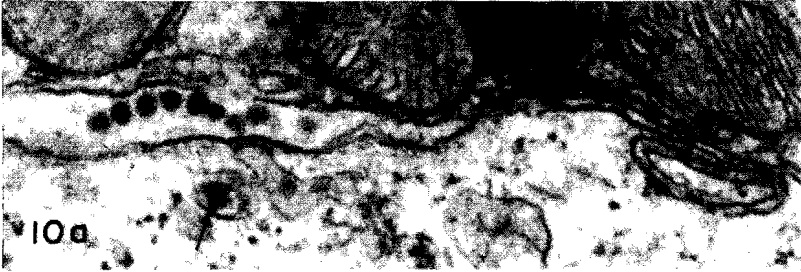


Fig. 10.— a y b. Partículas virales en el espacio intercelular de las fibras miocárdicas o dentro de vesículas del sarcoplasma (flechas). Nótese la diferencia en la densidad electrónica de las fibras. 60.000 X.

ch) Endotelio y virus. En todos los órganos examinados fué posible constatar la presencia de partículas virales en la luz de los espacios vasculares (Fig. 17). El endotelio de los vasos sanguíneos se examinó especialmente a nivel del cerebro, del corazón y de los pulmones. En ausencia de signos de replicación viral fué llamativo encontrar escasos detalles que



Fig. 11.— a) Citoplasma de una célula de Kupffer en el hígado de ratón recién nacido inoculado intracerebralmente con el virus de la EEV. La flecha señala 2 partículas virales en una vacuola. 60.000 X. b) Partícula viral (flecha) en contacto con la membrana plasmática de una célula de Kupffer que muestra signos de fagocitosis. 27.500 X.

hablaran de lesiones endoteliales. Las membranas y las uniones intercelulares no mostraban alteraciones y contrastaba muchas veces la abundancia de partículas virales en la luz de los vasos y en el espacio intercelular con la falta de NC o de partículas virales en el espesor del endotelio. El examen cuidadoso de los vasos especialmente a nivel de capilares del corazón demostró la penetración de partículas virales en vesículas de pinocitosis, con frecuencia en vesículas con mayor densidad electrónica alrededor de



Fig. 12.— Leucocito PMN neutrófilo con material de apariencia lipídica y membranas en fagolisosomas (cabezas de flechas), y un área de rarefacción citoplasmática, redonda, con algunas vesículas membranosas en su interior (flechas simples). 20.000 X.

su membrana. Las partículas virales se incorporaban en las vesículas pinocitóticas sin formar parte de la membrana de las mismas y se vieron en la parte media del endotelio o a nivel del lado vascular o tisular. Hallazgos similares fueron previamente reportados por nosotros en el corazón (51).



13

Fig. 13.— Célula mononuclear de aspecto linfomonocítico en un sinusoide hepático. En la superficie y en un área de rarefacción citoplasmática se ven partículas virales (flechas). 20.000 X.

d) **Desarrollo del virus de la EEV en el pulmón.** Las células epiteliales del alvéolo pulmonar mostraron escasas alteraciones. Algunos neumocitos granulares presentaban vacuolización del citoplasma y dilatación de las mitocondrias con ruptura de la membrana celular y salida de elementos citoplasmáticos al espacio alveolar, pero en general los citosomas laminares de estas células y el citoplasma de los neumocitos membranosos no presentaban alteraciones ni evidencias de replicación viral (Fig. 18). Las células

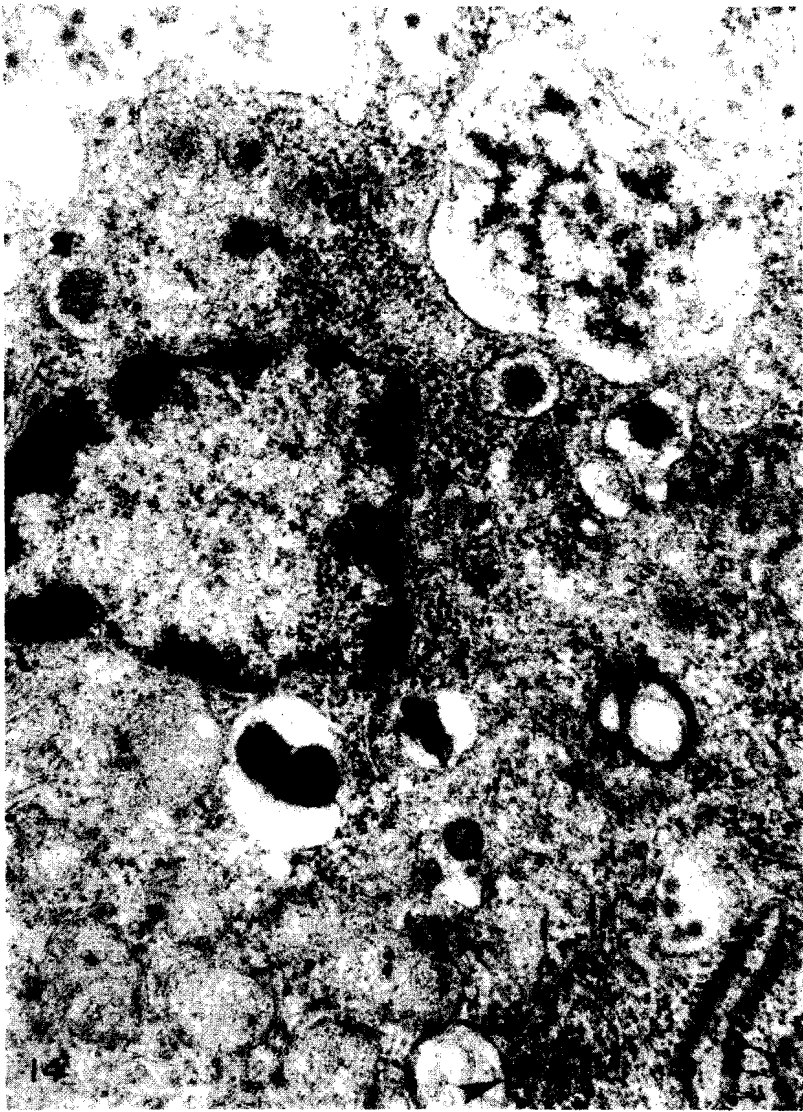


Fig. 14.— Célula reticular del bazo en ratón recién nacido inoculado intracerebralmente con virus de EEV. Se ven signos evidentes de replicación viral en el extremo inferior de la fotografía; un área de viroplasma es señalado por una cabeza de flecha y numerosos nucleocápsidos están libres o adheridos a las membranas de las cisternas celulares (flechas simples). En la parte media de la fotografía se ven lisosomas (flechas gruesas) en la vecindad de vacuolas que contienen partículas virales o material degradado. En algunas vacuolas el contenido electrodensito de los lisosomas primarios se vierte en su interior donde se hayan algunas partículas virales. 40.000 X.

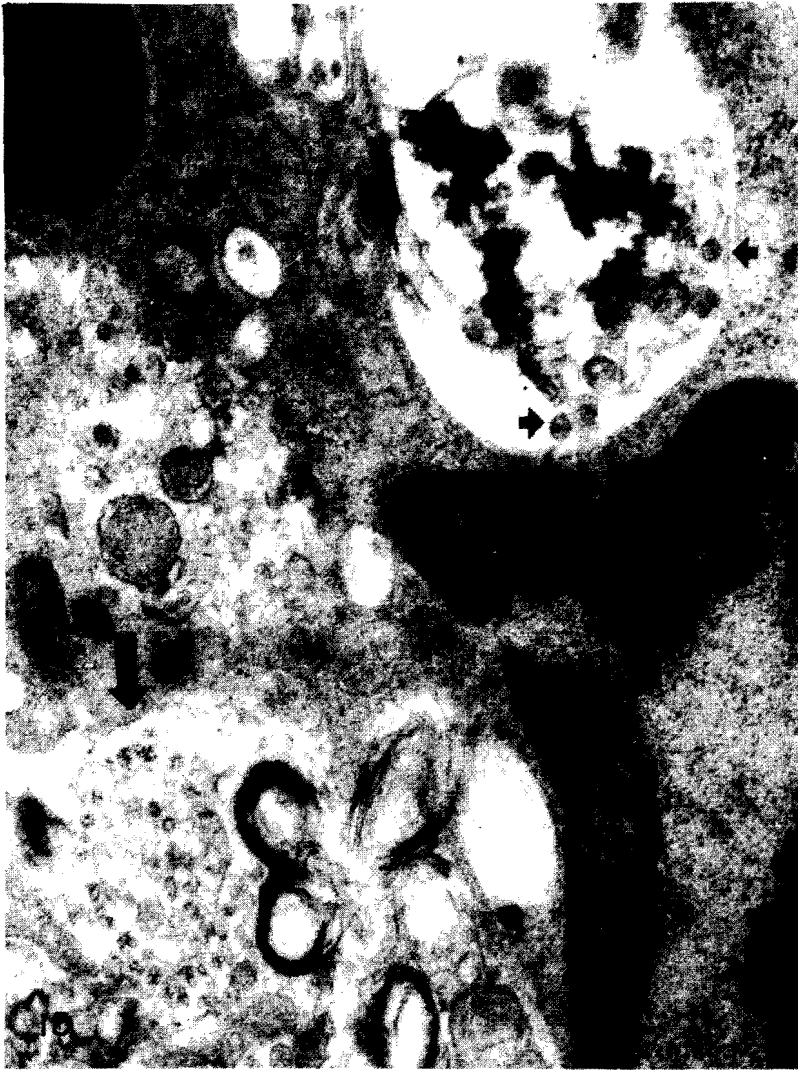


Fig. 15.— Detalle de un macrófago con numerosos fagolisosomas en su citoplasma y con vacuolas que contienen membranas y material de apariencia necrótica (flechas cortas). Se ven vesículas del tipo CPV1 (flecha grande) y en la pared de las vacuolas se ven membranas redondeadas. 45.000 X.

del epitelio bronquial y células claras no mostraron alteraciones a pesar de verse numerosas partículas virales en el material electrodensó con aspecto de plasma sanguíneo que se veía entre los cilios y vellosidades de estas células (Fig. 19). El espacio intersticial alveolar se mostró bastante ensanchado. Los histiocitos y fibroblastos o los macrófagos presentes en

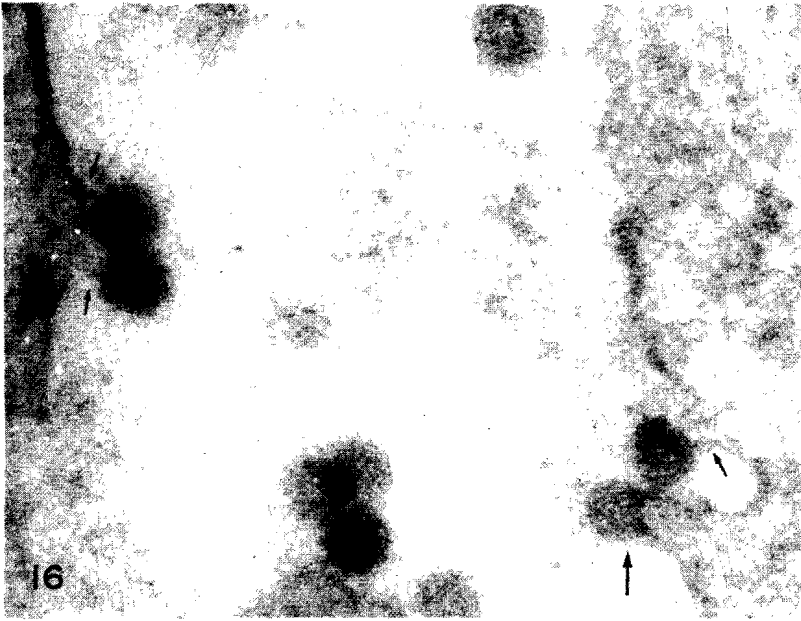


Fig. 16.— Varias partículas del virus de la EEV en fase de gemación. Las flechas señalan uniones de las partículas con la membrana plasmática. 162.500 X.

este espacio mostraban con frecuencia vacuolas en el citoplasma o dilatación de las cisternas del retículo endoplasmático. Entre estas células y las fibras colágenas se vieron frecuentemente partículas virales. En algunos fibroblastos fué posible identificar partículas precursoras NC, y se vieron figuras de gemación hacia el espacio intercelular a nivel de la membrana plasmática. En la luz de los vasos se vieron partículas virales y con frecuencia leucocitos.

1.2.— Actividad de la fosfatasa ácida

En los animales utilizados como control de la infección, los depósitos de plomo que marcan la actividad de la fosfatasa ácida se ubicaron en las cisternas del aparato de Golgi y en los lisosomas. En los ratones inoculados con el virus de la EEV se notó un aumento evidente de los depósitos de plomo en forma de pequeños gránulos o de cristales, llenando las cisternas tubulares de los tortuosos complejos de Golgi (Fig. 20a), al igual que las frecuentes vesículas y vacuolas en cuyas membranas se adherían los NC, o en cuyo interior se encontraban las partículas virales de 45 nm. El retículo endoplasmático rugoso mostró con frecuencia depósitos de plomo en sus cisternas al igual que en la cisterna perinuclear (Figs. 20b, 21a). En las neuronas osmiofílicas, o de aspecto francamente



Fig. 17.— Capilar pulmonar con numerosas partículas virales en la luz (flechas). 27.500 X.

necrótico, el precipitado fino de plomo en gránulos densos fue evidente (Fig. 21b).

1.3.— Estudio de las partículas virales con tinción negativa

a) **Estudio del virus purificado y de sus componentes estructurales.** La centrifugación del primer gradiente de sacarosa de acuerdo con lo señalado en la sección 1.4.a de material y métodos, reveló tres bandas de proteínas, pero solo una de ellas cerca del fondo del gradiente coincidió con la actividad hemaglutinante. Estas fracciones fueron centrifugadas y el

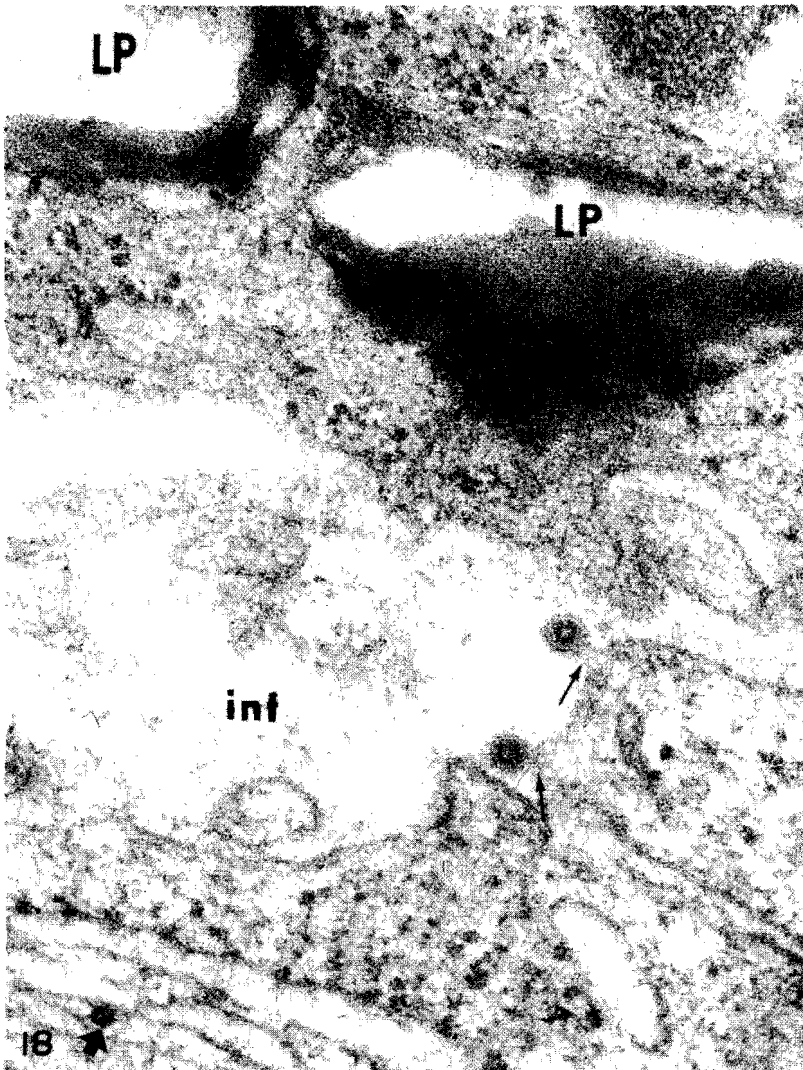


Fig. 18.— Parte basal de un neumocito granular que muestra sus citosomas lipídicos (LP) y el núcleo. En el espacio intersticial del alveólo (int) se ven dos partículas virales naciendo por gemación (flechas simples). La flecha corta muestra un nucleocápsido en el citoplasma. 106.250 X.

precipitado obtenido mostró partículas esféricas de 55 a 60 nm con un centro de 30-40 nm y rodeadas por una envoltura de superficie externa irregular con apariencia de espículas cortas (Figs. 22a, 22b, 22c). En ocasiones la envoltura de las partículas presentaba proyecciones con aspecto globular (Fig. 23a). Cuando esta fracción fué separada en el segundo gradiente de sacarosa, se obtuvo una curva cuyos gráficos han sido previamen-

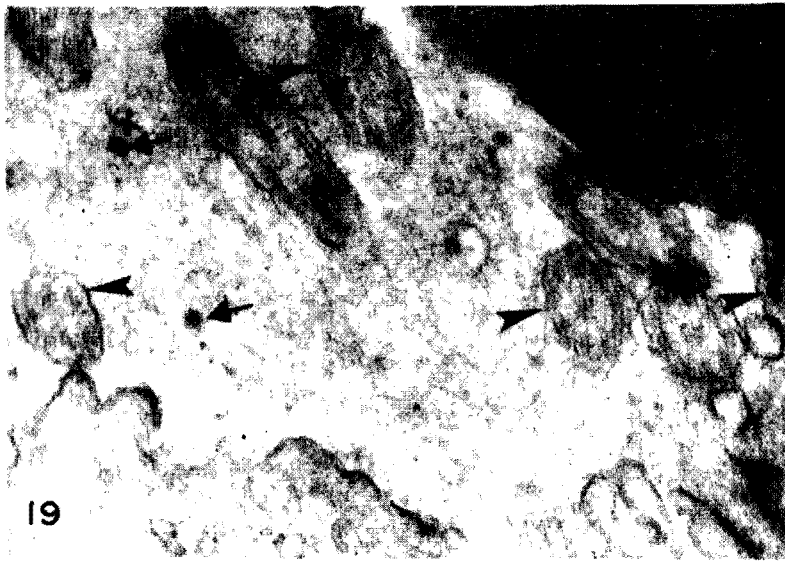


Fig. 19.— Cilios de una célula bronquial (cabezas de flechas) y partículas virales en la luz bronquial (flechas). 60.000 X.

te reportados⁽⁵³⁾, y en la cual las bandas de ribonucleoproteínas y la actividad hemaglutinante se localizaron en la región de mayor densidad del gradiente. La curva fué limpia, libre de contaminación y el pequeño pico al final corresponde a restos del material colocados en el tope del gradiente. La centrifugación de las fracciones 1 al 3 del segundo gradiente, cuando se observó con el microscopio electrónico, correspondió a una muestra pura en la que se observaron abundantes partículas virales de 55 a 60 nm, similares a las descritas previamente. Algunas mostraron ruptura de la envoltura y se observó fusión de varias partículas (Fig. 23b).

Cuando se trataron las muestras con DOC se evidenciaron dos bandas de absorción, una sin actividad hemaglutinante en las fracciones mas densas del gradiente, y otra en el tope donde se concentró la actividad hemaglutinante. La gráfica reportada previamente⁽⁵³⁾ señala estas características.

El estudio con el ME de las fracciones del fondo del gradiente demostró partículas redondeadas de 30 a 40 nm formadas por subunidades circulares en forma de anillos que medían entre 10 y 12 nm. Estas estructuras ofrecen la apariencia de nucleocápsidos con simetría icosaédrica (Figs. 24a y 24b). Las subunidades se vieron disociadas de los nucleocápsidos en algunas oportunidades.

El estudio con el ME de las fracciones del tope del gradiente tratado con DOC, mostró subunidades con tamaño aproximado de 12 a 18 nm,

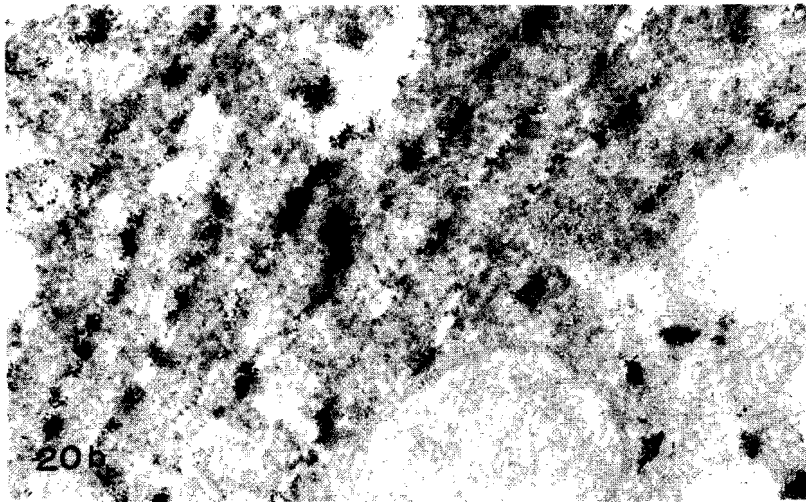
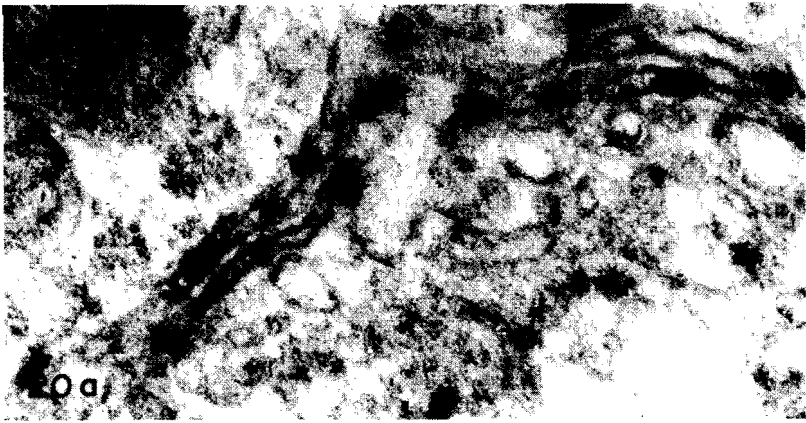


Fig. 20.— Neurona de ratón inoculado intracerebralmente con el virus de la EEV. a) Actividad de fosfatasa ácida en las cisternas del aparato de Golgi. 162.500 X. b) Actividad de fosfatasa ácida en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso. El material ha sido contrastado únicamente con acetato de uranilo. 106.250 X.

algunas con forma circular, las otras en forma de media luna y con proyecciones espiculares (Figs. 24c y 24d).

b) **Estudio de las partículas del virus de la EEV en presencia de suero con anticuerpos.** Cuando se estudian las muestras del virus de la EEV en presencia de suero con anticuerpos anti-EEV se producen dos tipos de fenómenos de acuerdo con la concentración de la solución utilizada. Cuando no se diluyen suficientemente las muestras se forman conglomerados

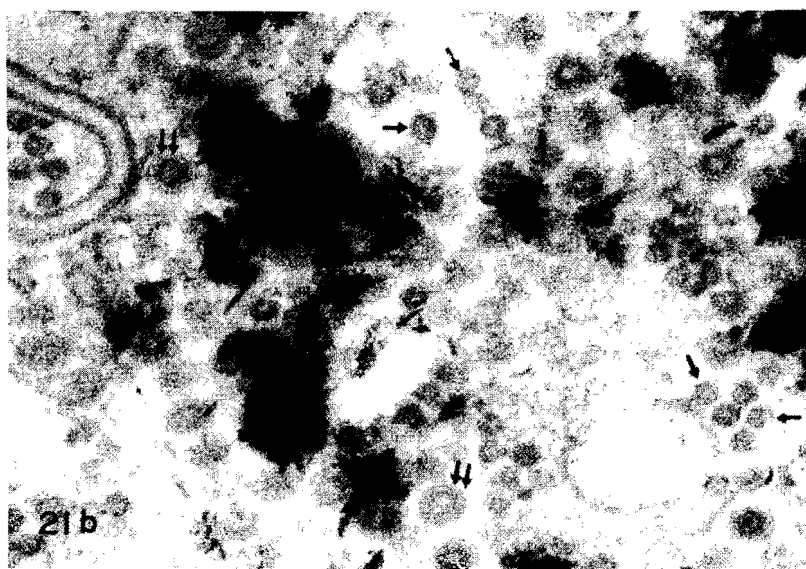
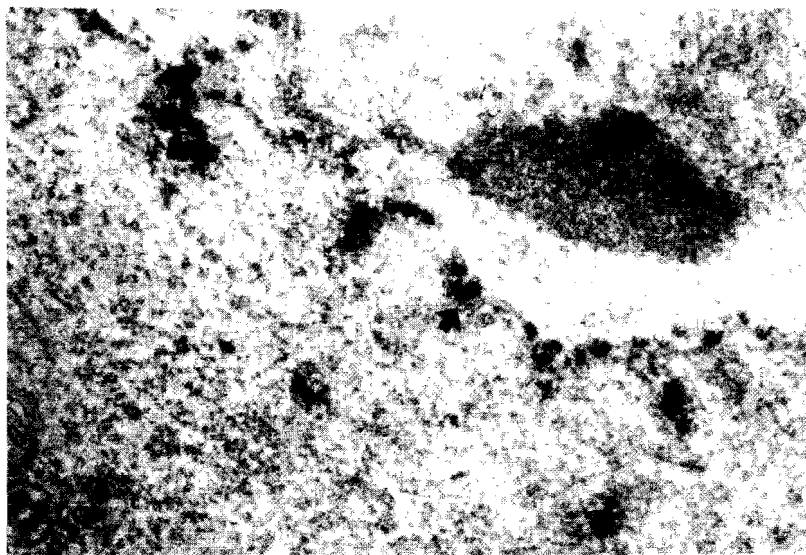


Fig. 21.— Neurona de ratón inoculado intracerebralmente con el virus de la EEV. a) Actividad de fosfatasa ácida en la cisterna perinuclear (flecha gruesa). 60.000 X. b) Nucleocápsidos (flechas simples) y numerosas partículas virales (doble flecha) en vacuolas autofágicas que muestran actividad de fosfatasa ácida. 162.500 X.

de partículas virales difíciles de observar en tinción negativa por su volumen, pudiendo utilizarse únicamente las zonas marginales de estos grupos.

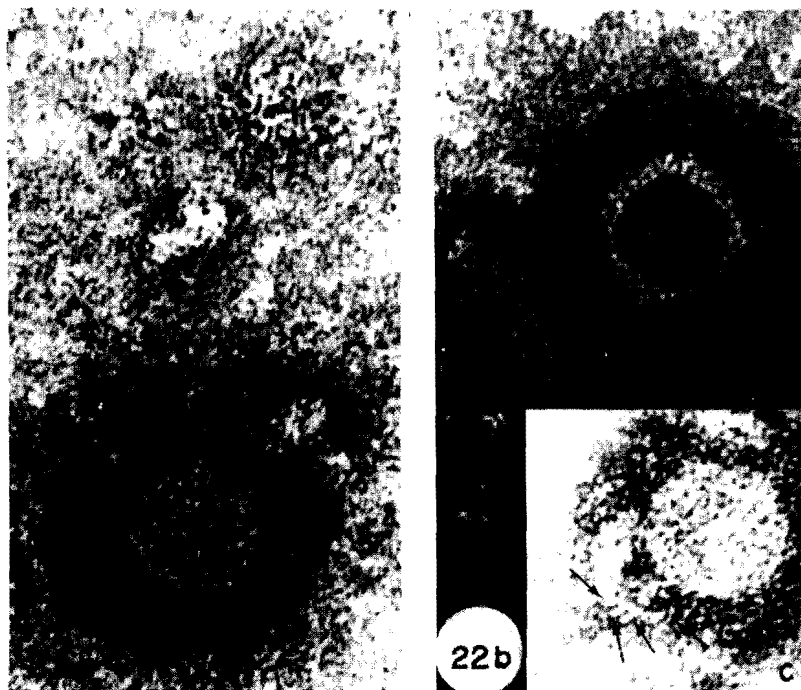


Fig. 22.— a, b, c. Tinción negativa de partículas del virus de la EEV purificado en gradientes de 15 a 30% de sacarosa y centrifugado a 41.400 g. Las flechas señalan las subunidades que deben corresponder a las hemaglutininas, ubicadas en la superficie de los viriones o libre en forma de rosetas o de espículas unidas entre sí. Estructuras similares fueron reportadas por nosotros en 1974 (53). 406.250 X.

Cuando la dilución es mayor se forman pequeños grupos en los cuales se puede observar mejor el efecto de la tinción negativa con acetato de uranilo o con fosfotunstato. Uniendo las partículas virales se ven delgados filamentos que miden de 25 a 30 nm de largo por 5 a 7 nm de diámetro. En ocasiones se observan estas estructuras filamentosas en forma de barras cortas que se unen formando una Y o que con forma de V unen dos partículas virales (Figs. 25a y 25b).

2. Experimentos en ratas: infección aguda

2.1.— Estudio histológico del bazo y del tejido nervioso en ratas inoculadas intraperitonealmente con el virus de la EEV

a) Estudio histológico del bazo:

4° día post inoculación. La arquitectura folicular no es tan evi-

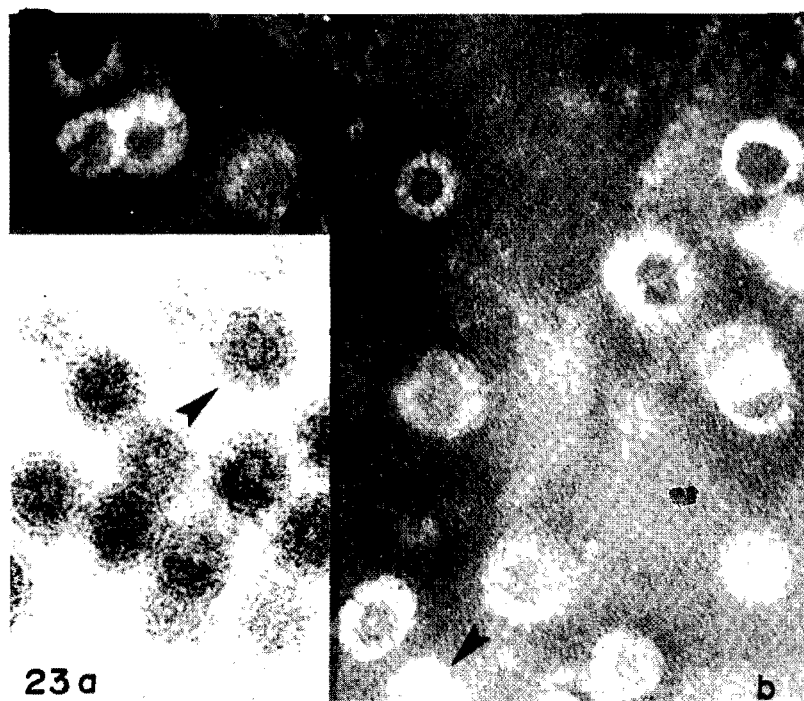


Fig. 23.— a) En el recuadro del extremo inferior de la fotografía se ven partículas virales en cortes finos, algunas de ellas con apariencia globular de las espículas superficiales (cabezas de flechas). 250.000 X. b) Tinción negativa del virus de la EEV purificado en un gradiente de sacarosa de 15 a 30%. Las cabezas de flechas muestran partículas virales con protusiones globulares en la envoltura, similares a las descritas por Horzinek y Munz en 1969, con el virus de la EEV purificado en gradientes de tartrato de potasio (74). 162.500 X.

dente como en el bazo de las ratas usadas como control; los límites entre la pulpa roja y los folículos son poco delimitados. Algunos folículos linfoides muestran moderada actividad fagocítica en los centros germinales. Hay un incremento de pequeños linfocitos alrededor de las arteriolas y a lo largo de las trabéculas; muchas de estas células aparecen con núcleos hipercromáticos, redondos u ovalados, con escaso citoplasma y en general en hileras o grupos que parecen estar en contacto con las paredes de los sinusoides esplénicos (Figs. 26a y 26b).

6° día post inoculación. Los folículos linfoides están bien delimitados y la actividad en los centros germinales es marcada, con abundantes macrófagos y células de núcleo oval o indentado con nucleolo prominente y numerosos pequeños linfocitos de núcleo irregular. En la periferia del

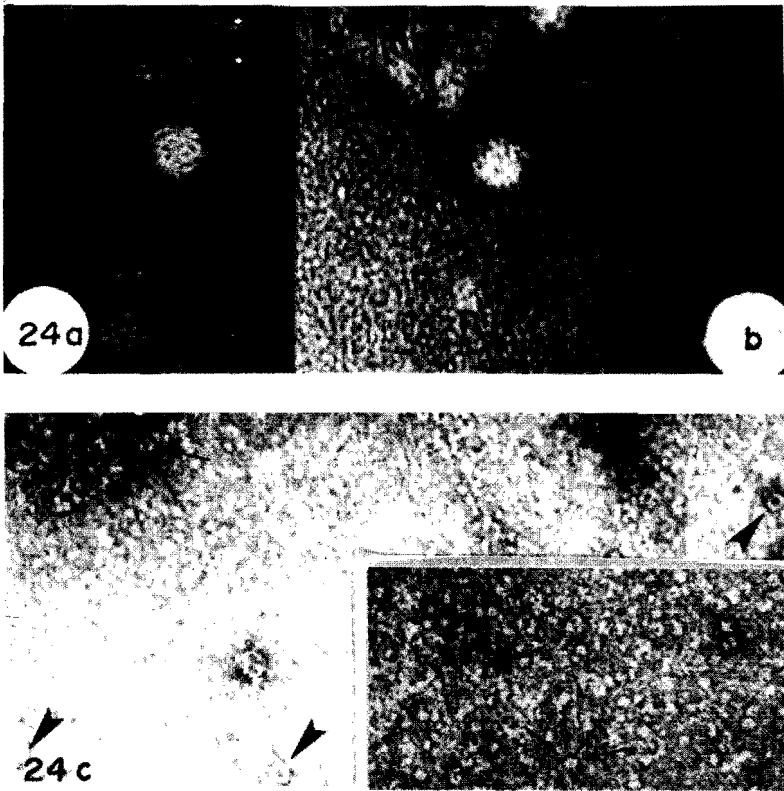


Fig. 24.— a y b) Nucleocápsidos del virus de la EEV aislados por purificación y tratamiento del virus con DOC. A pesar de la existencia de "ruido de fondo", se observan las subunidades capsoméricas en los nucleocápsidos que miden 25 a 32 nm de diámetro. 406.250 X. c y d) Tinción negativa de fracción hemaglutinante de un gradiente de virus de la EEV purificado y tratado con DOC. Se ven las subunidades que deben corresponder a las glicoproteínas E1 y E2, tienen un diámetro entre 5 y 8 nm (flechas simples). Se ven anillos circulares de 10 a 12 nm de diámetro (cabezas de flechas) similares a los descritos por Narayan en cultivo de células malignas (112). 406.250 X.

folículo se ven células mononucleares con aspecto de medianos y pequeños linfocitos, células reticulares y plasmocitos. Al examinar cuidadosamente el centro germinal se ven abundantes plasmoblastos y plasmocitos y las células reticulares de nucleolo prominente muestran signos de fagocitosis. Se ven mitosis típicas. En dos casos se vieron células multinucleadas con aspecto de histiocitos y evidencia de fagocitosis. La población de linfocitos alrededor de los vasos y de las trabéculas es menos evidente (Figs. 27a y 27b).

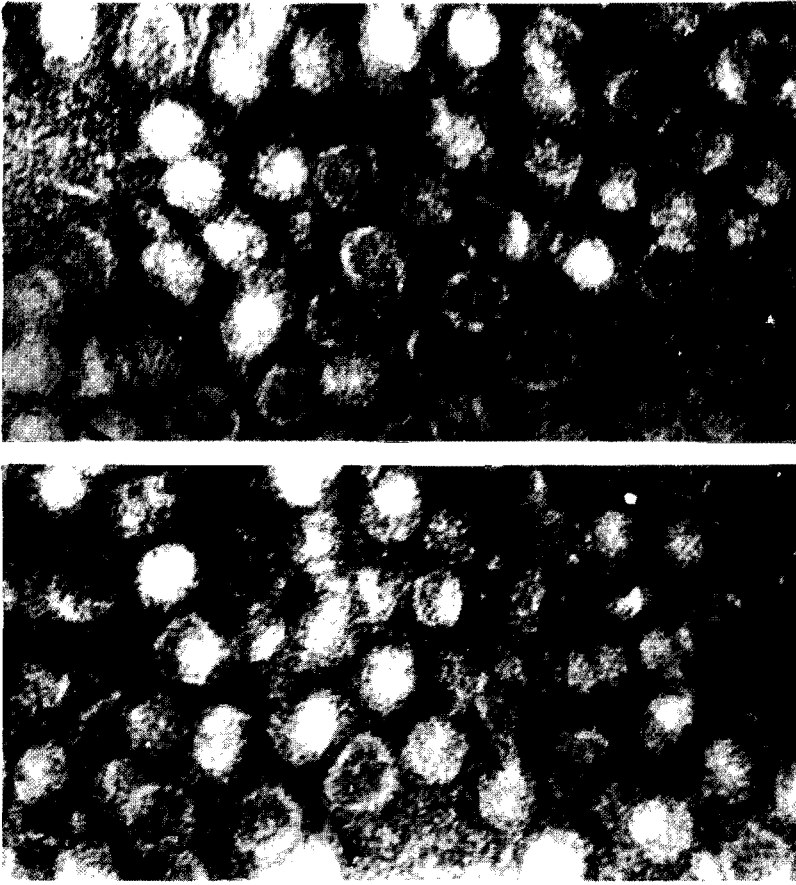


Fig. 25.— a y b) Partículas virales en presencia de suero con anticuerpos anti-EEV, demostrando aglutinación de los viriones; algunas de las partículas virales se ven unidas por puentes en forma de banda o de Y (cabezas de flechas). 162.500 X.

8° día post inoculación. Los folículos linfoides son muy prominentes, algunos miden el doble del tamaño normal, otros se hacen confluentes con una doble corona alrededor del centro germinal muy activo, la mas interna de pequeños linfocitos y la mas periférica formada por plasmocitos, plasmoblastos, células reticulares y mononucleares de núcleo bien teñido. En el centro germinal la población linfocitaria es mixta, hay pequeños linfocitos pero predominan las células mononucleares mas grandes con núcleos ovales o indentados y uno o varios nucleolos pequeños. Fagocitos de citoplasma espumoso con signos evidentes de fagocitosis también se ven en el centro germinal (Figs. 28a y 28b).

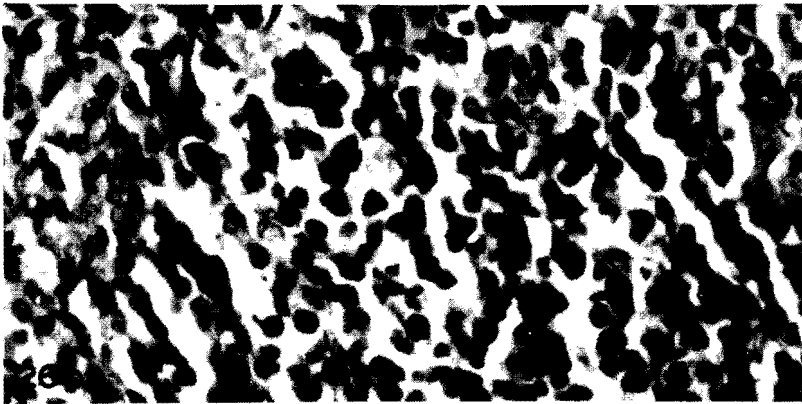
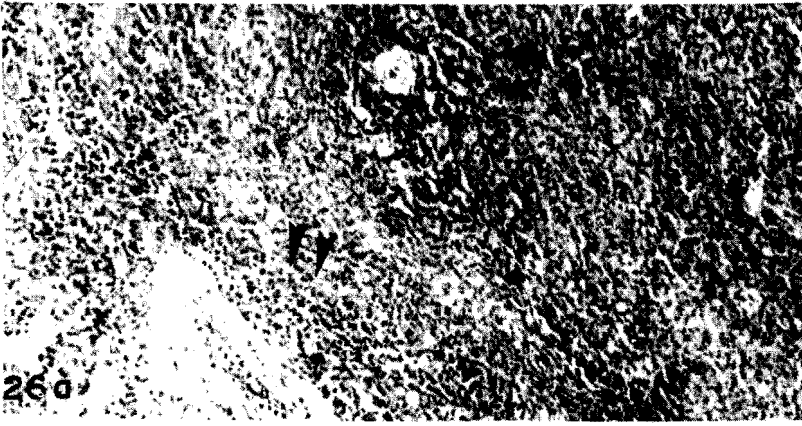


Fig. 26.— Bazo de rata inoculada 4 días antes por vía ip con 200 upf de virus de la EEV, cepa Guajira. a) Se ve aumento de la población linfocitaria perivascular y peritrabecular (cabeza de flecha). 100 X. b) Se observa un área de incremento celular periarterial con células mononucleares hiper cromáticas en la zona correspondiente a los linfocitos T. 400 X.

b) Estudio histológico del tejido nervioso.

4° día post inoculación. Las meninges comienzan a ser infiltradas por células mononucleares. Los espacios de Virchow-Robin están ensanchados y en algunos de ellos, vecinos a la superficie de corteza cerebral, se ven células mononucleares y algunos leucocitos PMN. En algunas áreas, el infiltrado meningeo es mayor y desde las meninges o de los espacios perivasculares cercanos se ven células mononucleares y algunos PMN con aspecto macrofágico, que infiltran las capas superficiales de la substancia gris cortical. Hay áreas focales en la corteza que muestran necrosis isquémica aguda de las neuronas, con moderado edema intersticial y en unas

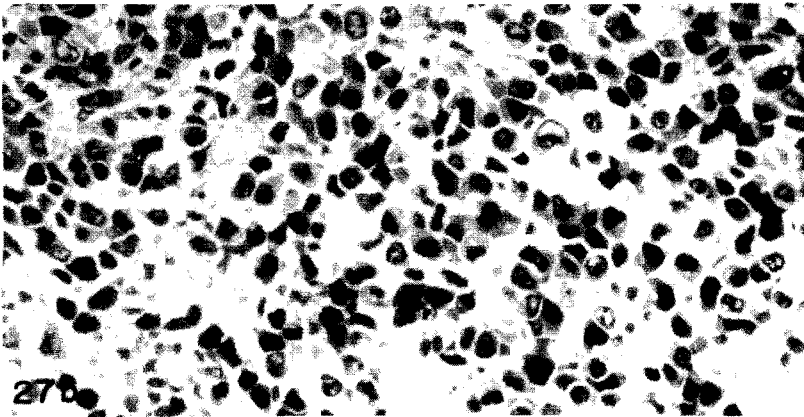


Fig. 27.— Bazo de rata inoculada 6 días antes por vía ip con 200 ufp del virus de la EEV, cepa Guajira. a) Se observa un folículo linfático con marcada actividad fagocítica en el centro germinal y aumento de la celularidad en la periferia. Se ven grupos de pequeños linfocitos periarteriolares en la pulpa roja (cabezas de flechas). 100 X. b) Se ve un corte de una micra de espesor del material incluido en Araldita para estudio ultraestructural. Se observa que la mayoría de las células son plasmoblastos y plasmocitos, entre las cuales se ven macrófagos. 400 X.

zonas con focos de degeneración esponjosa. Se ven áreas con microgliosis difusa y astrocitos reactivos en las zonas más edematosas o vecinos al infiltrado con células mononucleares (Figs. 29a, 29b, 29c, 29d).

6° día post inoculación. Hay un incremento de las células inflamatorias que infiltran las meninges y los espacios perivasculares invadiendo

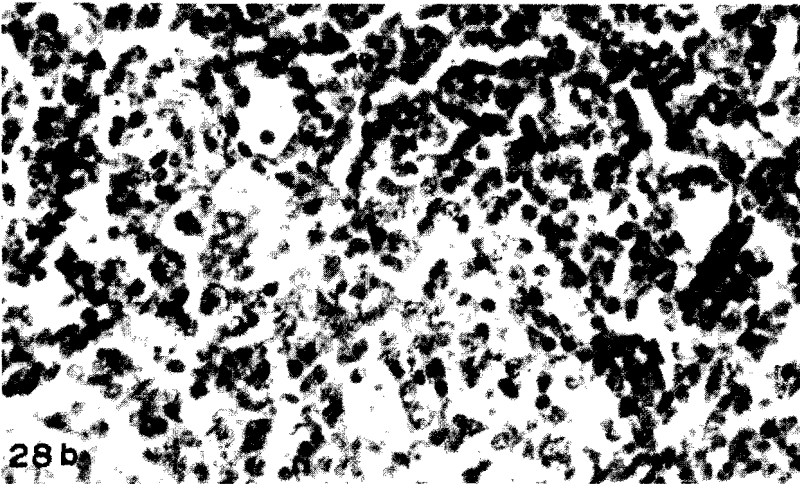
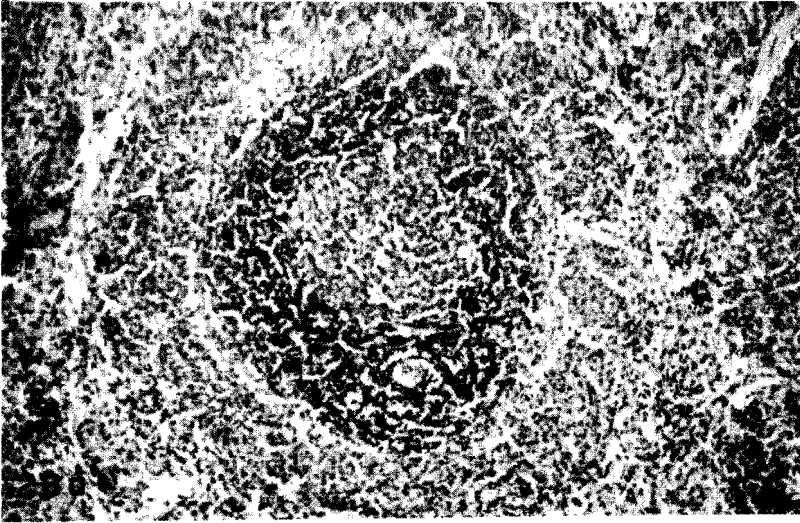


Fig. 28.— Bazo de rata 8 días después de la inoculación ip con virus de la EEV, cepa Guajira. a) Se observa un collar de pequeños linfocitos rodeando el centro germinal del folículo que muestra actividad fagocítica; en la periferia se ve incremento de células reticulares, plasmocitos y células linfomonocíticas. 100 X. b) Se observa la periferia del folículo y área central en las que se aprecia la actividad fagocítica, la celularidad mononuclear mixta de pequeños y medianos linfocitos y plasmocitos y la presencia de mitosis. 400 X.

áreas de la corteza cerebral con edema severo y espongiosis. En estos focos la necrosis isquémica de las neuronas es muy severa y ya hay áreas donde

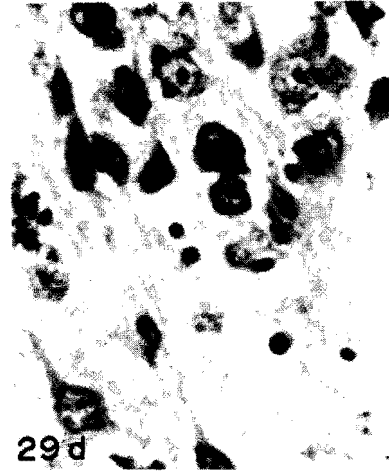
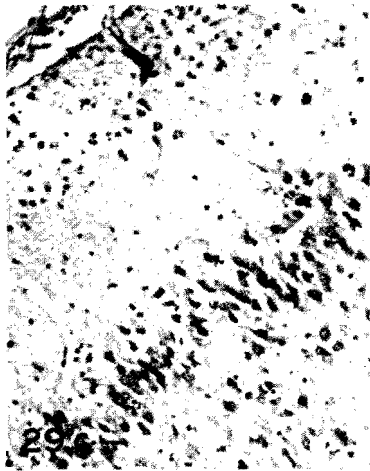
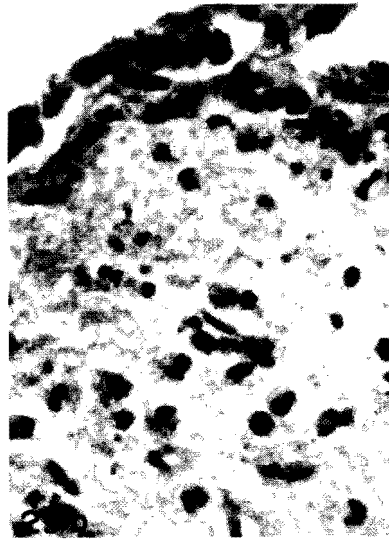
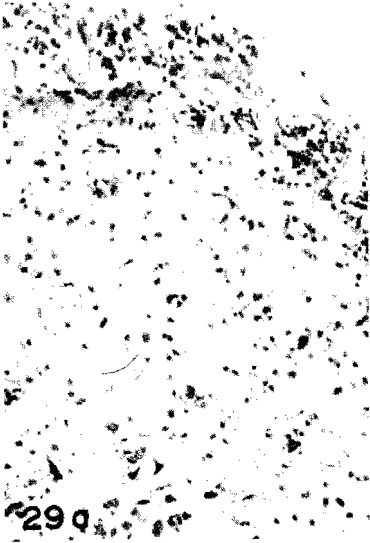


Fig. 29.— SNC de rata 4 días post inoculación ip con virus de la EEV. a) Se observa infiltración meníngea con células mononucleares que se extiende a los espacios de Virchow-Robin y a la sustancia gris cortical. 100 X. La figura b, a mayor aumento, demuestra las células mononucleares y PMN en la capa molecular de la corteza. Hay edema y aspecto espongiótico. 400 X. c) Muestra la corteza cerebral edematosa con infiltración que se extiende desde las meninges y que es similar, a la observada en la figura b; hay neuronas con signos de necrosis isquémica aguda. 100 X. En la figura d, se observa necrosis isquémica aguda de neuronas corticales, edema e infiltración con células mononucleares y algunos leucocitos PMN. 400 X.

han desaparecido numerosas células nerviosas y se nota una actividad fagocítica intensa. Se confunden las células mononucleares perivasculares con los macrófagos o células microgliales y entre ellas se puede precisar el origen hematógeno de algunas, sobre todo cuando van acompañadas de leucocitos PMN en las áreas de necrosis. Alrededor de algunos de estos focos se nota astrogliosis difusa (Figs. 30a, 30b, 30c, 30d).

8° día post inoculación. Áreas de necrosis en la corteza cerebral y en zonas del mesencéfalo. En los reblandecimientos corticales se ven numerosas células granuloadiposas con intensa actividad fagocítica. Se ven manguitos perivasculares con células mononucleares y la actividad microglial es intensa focalmente y en forma difusa sobre todo en la corteza cerebral. Hay signos de necrosis isquémica en grupos de neuronas piramidales del hipocampo y en algunas células de Purkinje. Los astrocitos reactivos se hacen más evidentes en la vecindad de las áreas de mayor edema. La pérdida de neuronas en grandes sectores de la corteza cerebral es evidente (Figs. 31a, 31b, 31c).

3. Experimentos en ratas: sobrevivientes

3.1.— Resultados del estudio histológico y estructural del sistema nervioso de ratas sobrevivientes a la infección con el virus de la EEV

a) **Examen con el microscopio de luz.** El estudio del tejido nervioso en las ratas un mes después de la inoculación con el virus de la EEV mostró áreas focales de reblandecimiento en la corteza cerebral con células granuloadiposas infiltrando la zona y alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 32a). Se ven también infiltrados perivasculares con células mononucleares en las meninges, a nivel del hipocampo, corteza cerebral y mesencéfalo. En la periferia de las áreas de reblandecimiento se vió proliferación moderada de astrocitos y de células microgliales (Fig. 32b). La microgliosis era evidente también en las zonas de la corteza cerebral que mostraron reducción del número de neuronas focalmente. En la circunvolución del hipocampo y en el asta de Ammon se vieron abundantes manguitos perivasculares con células mononucleares y disminución focal en número de las neuronas piramidales. Tres meses después de la infección con el virus de la EEV, el cerebro de las ratas mostró las áreas de necrosis cavitaria en la corteza cerebral con muy discreta cantidad de células granuloadiposas, proliferación de pequeños vasos sanguíneos y astrogliosis reactiva periférica. Las células mononucleares y los bastoncitos microgliales eran abundantes en la vecindad de las áreas de reblandecimiento cortical y los manguitos perivasculares aunque presentes, se vieron en menor proporción que en el cerebro de las ratas un mes después de la infección. La respuesta microglial era muy evidente en áreas focales de la corteza cerebral y en

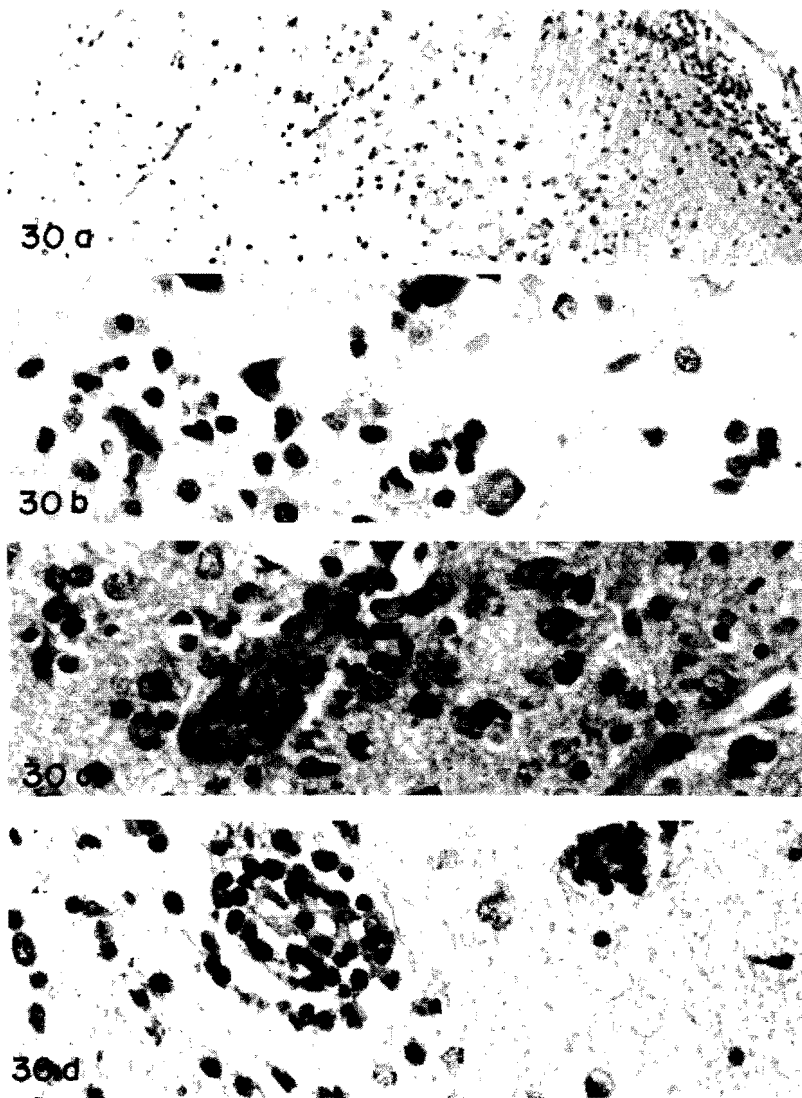


Fig. 30.— SNC de rata 6 días después de la inoculación ip con el virus de la EEV. En la figura a, se observa un foco espongiótico en la corteza con pérdida de neuronas e intensa microgliosis que se extiende desde la superficie de las meninges y la capa molecular muy infiltradas por células mononucleares. 100 X. La figura b, a mayor aumento, muestra un área cortical que presenta necrosis isquémica neuronal y neuronofagia en un área infiltrada por células mononucleares fagocíticas. 100 X. Las figuras c y d, muestran infiltrados perivascuales con severo edema y astrogliosis reactiva. 400 X.

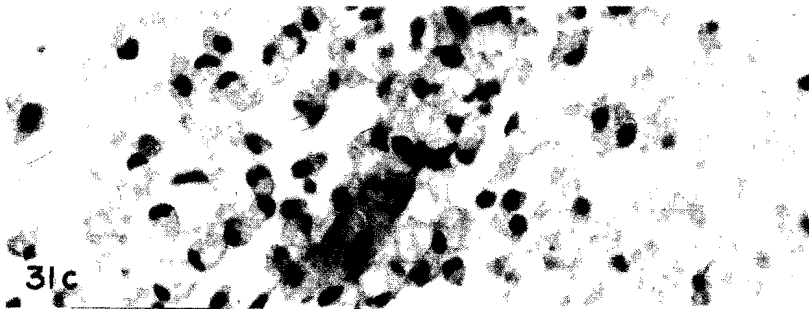
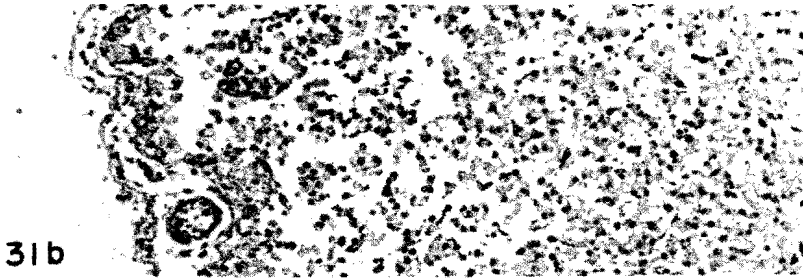
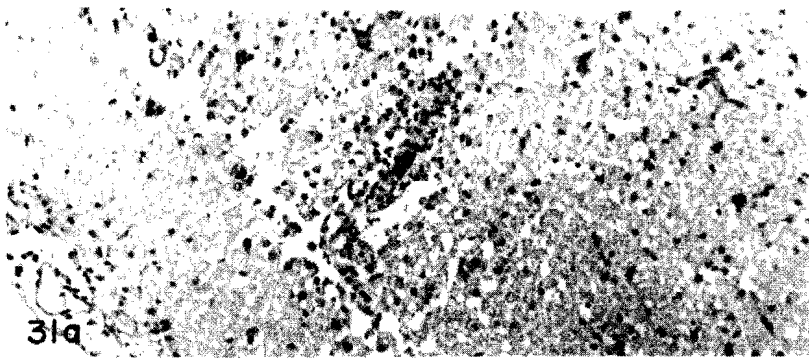


Fig. 31.— Areas de reblandecimiento cerebral en las ratas 8 días después de la inoculación ip con 200 ufp del virus de la EEV. En las figuras a y b, se ven células granuloadiposas y reacción astrogliar periférica. 100 X. La figura c, es un mayor aumento de la figura a, que señala la intensa actividad macrofágica perivascular en un área de reblandecimiento 400 X.

general adoptó una organización difusa predominantemente en las zonas grises corticales y del mesencéfalo. Se vieron focos de degeneración espongiiformes en la corteza cerebral y en áreas pequeñas de la substancia blanca con presencia de células mononucleares y microgliosis reactiva.

b) Examen con el microscopio electrónico. El hallazgo más característico fué la presencia en el neuropilo y alrededor de las neuronas de

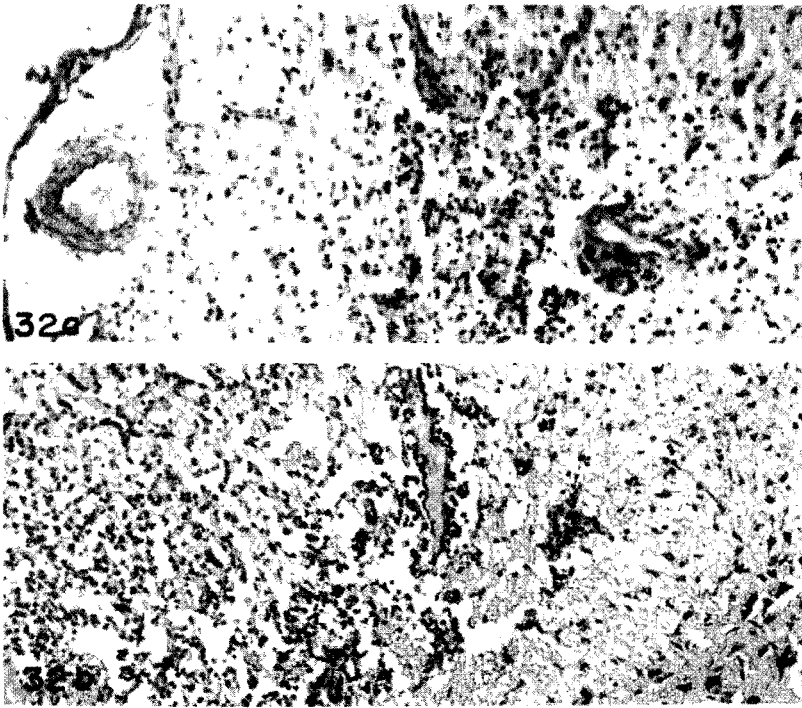


Fig. 32.— a) Area de reblandecimiento antiguo en una rata inoculada por vía ip un mes antes, con 200 ufp del virus de la EEV. Se ve reacción astrogliol intensa y microgliosis. 400 X. b) Area marginal de un reblandecimiento antiguo (3 meses) en el cual se ven macrófagos y otras células mononucleares de estirpe microglial y astrogliosis reactiva periférica. 400 X.

células mononucleares redondeadas o de aspecto amiboideo, las cuales infiltraban el tejido nervioso. Alrededor de los vasos se vieron linfocitos, macrófagos y algunos plasmocitos (Fig. 33). Las células mononucleares macrofágicas o amiboideas parecían migrar desde la periferia de los vasos y en algunas oportunidades la naturaleza pericítica de las mismas parecía evidente (Fig. 34). En otras áreas las células mononucleares eran semejantes a los monocitos de la sangre; su núcleo redondo u ovalado, con citoplasma cargado de lisosomas y prolongaciones amiboideas algunas veces digitiformes que se introducen en el neuropilo (Fig. 35). En algunas neuronas rodeadas por los pseudópodos de las células microgliales se observaron alteraciones de las organelas citoplasmáticas y ruptura de las membranas. Los procesos pedales de los astrocitos estaban hinchados y se observaron astrocitos gigantes con binucleación y presencia de fibrillas gliales en el citoplasma.

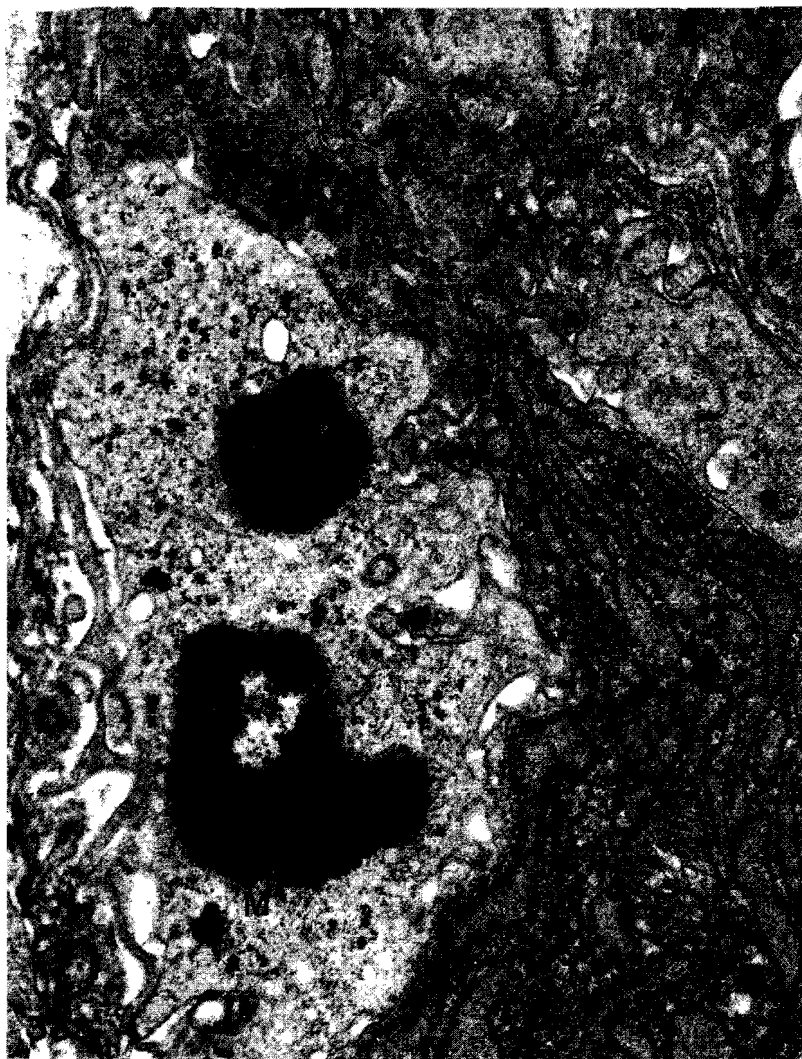
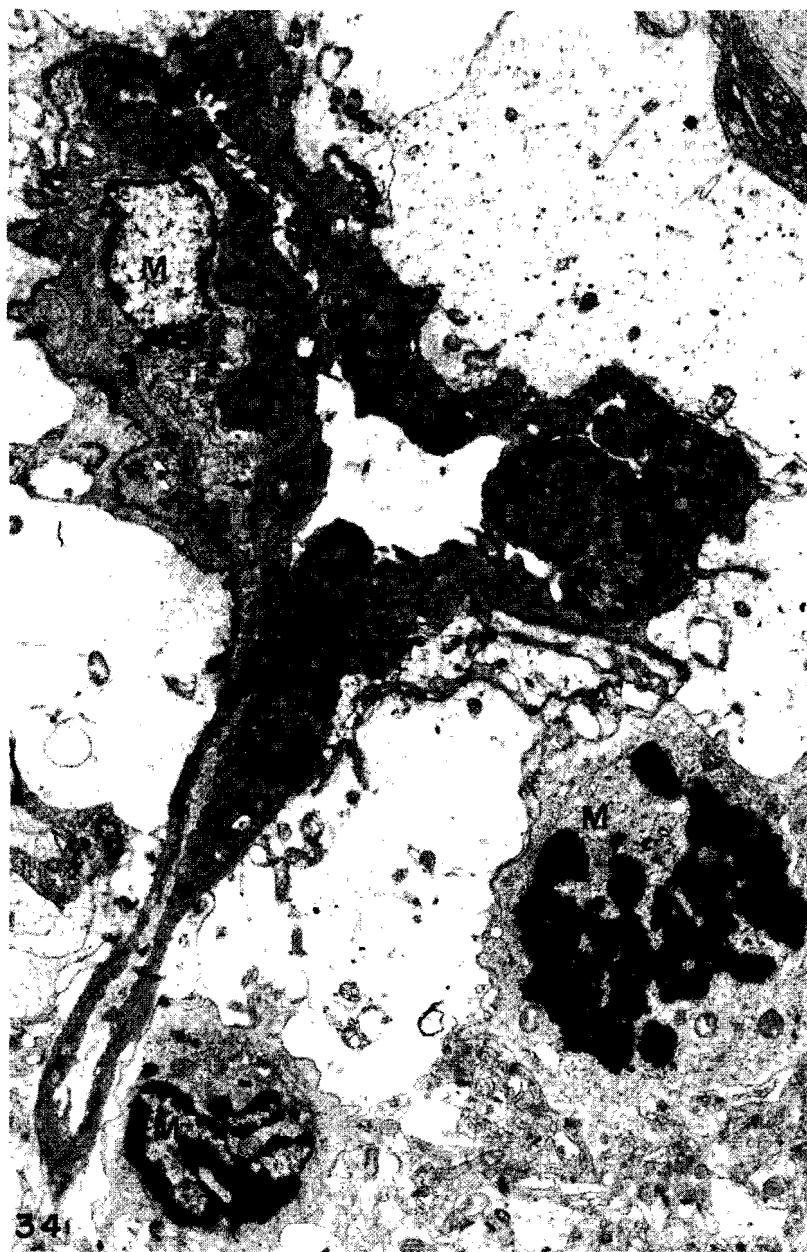


Fig. 33.— Infiltrado inflamatorio en el neuropilo 3 meses después de la infección aguda con el virus de la EEV. Se observa parte del citoplasma de un macrófago mononuclear (M), y de un plasmocito con abundante retículo endoplasmático rugoso (P). 15.000 X.

Se vieron alteraciones en los axones, caracterizadas por ensanchamiento o dilatación del axoplasma con abundantes vesículas y gránulos osmiofílicos y mitocondrias. En general, no se vieron alteraciones de la vaina de mielina y se pudo constatar que las alteraciones de hinchamiento en los axones eran focales dejando áreas del axoplasma de aspecto normal.



34
Fig. 34.— Vaso sanguíneo en la corteza cerebral. Alrededor del vaso se ven pericitos mononucleares similares en las características de su citoplasma (con lisosomas y prolongaciones pseudopódicas) a las células que se ven infiltrando el neuropilo. Alrededor del vaso se observa dilatación de los procesos pedales de los astrocitos. 4.000 X.



Fig. 35.— a) Célula mononuclear con lisosomas y complejo de Golgi en el citoplasma y presencia de pseudópodos (flechas gruesas). Las flechas mas pequeñas señalan áreas de unión entre estas prolongaciones y una neurona. 15.000 X. b) Célula nerviosa que se encuentra rodeada por las prolongaciones filopódicas de una célula M. Las flechas señalan los pseudópodos. En el extremo superior se observa vacuolización del citoplasma neuronal. 15.000 X.

4. Experimentos en ratas: efecto del virus de la EEV sobre la toxoplasmosis cerebral.

Las evidencias de toxoplasmosis en las ratas Sprague-Dawley se basaron en la descripción previa de lesiones histológicas que produce el *Toxoplas-*

ma gondii en el sistema nervioso central cuyas referencias bibliográficas están citadas en la discusión del trabajo (41, 42, 80, 99). Los 26 animales utilizados en el experimento fueron sacrificados por decapitación de acuerdo con el siguiente esquema: Dos animales el 4° día post inoculación, 4 el sexto y 4 el octavo día. Entre el sexto y octavo día murieron durante la noche 2 ratas las cuales no se examinaron histológicamente. Entre el octavo y el duodécimo día murieron tres ratas las cuales por motivos similares no pudieron ser utilizadas para el examen histológico. El décimo día se sacrificaron 3 ratas y el duodécimo día tres animales. El día 15 se decapitaron tres ratas, una de las cuales mostraba signos de parálisis. Las cuatro ratas sobrevivientes fueron sacrificadas un mes después de la inoculación.

En nuestro estudio se observaron signos histológicos de toxoplasmosis en 17 de los 23 animales inoculados con el virus (74%) y en 6 de 8 controles (75%).

En las ratas utilizadas como control se observaron ocasionalmente en el tejido nervioso quistes conteniendo abundantes formas parasitarias de aproximadamente 3 x 5 micras de diámetro. Se vieron áreas focales con células epiteliales y evidencia de actividad fagocítica, con escasas células mononucleares o polimorfonucleares en su periferia (Fig. 36), alrededor de algunos vasos se vieron discretos infiltrados linfocitarios.



Fig. 36.— Lesión granulomatosa en la corteza cerebral de una rata control. Se observan escasas células mononucleares y con reacción microglial. Alrededor de un vaso se vé discreto infiltrado con células mononucleares. 25 X.

Los quistes conteniendo abundantes formas parasitarias se observaron en los casos tanto controles como experimentales a nivel de la corteza cerebral (Fig. 37a). En los animales inoculados con el virus de la EEV se observó que después del 4to. día de inoculación era frecuente un área de rarefacción alrededor de los quistes o se observaba un espacio entre los parásitos contenidos en los quistes y el tejido nervioso (Fig. 37b); en otras áreas el quiste era reemplazado por numerosas células vacuolares hincha-

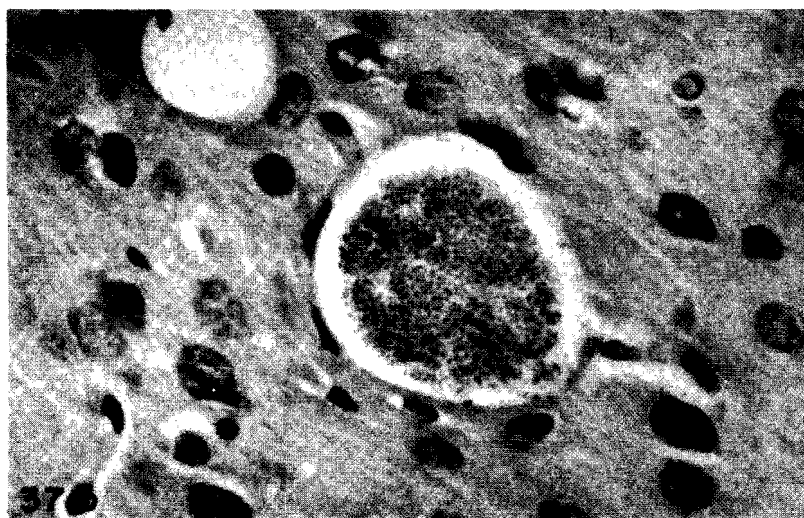
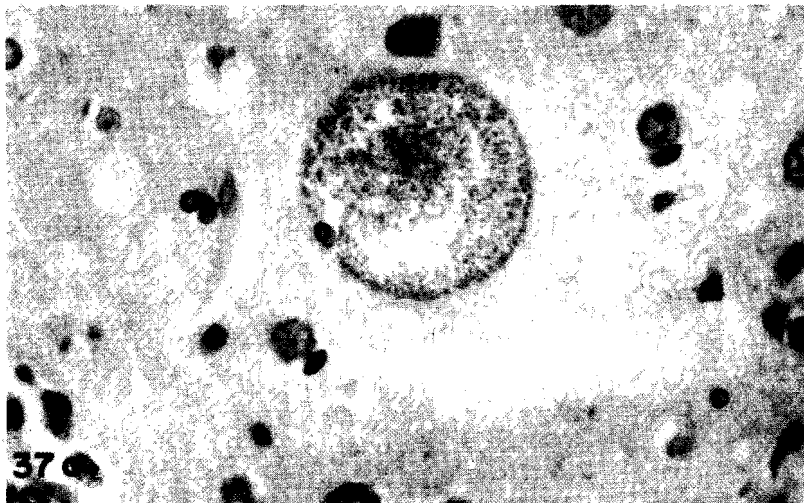


Fig. 37.— Cuarto día post inoculación con el virus de la EEV. a) Quiste con abundantes toxoplasmas en la corteza cerebral de una rata control. 400 X. b) Se observa un quiste con un espacio lúcido entre los parásitos y su pared. 400 X.

das, todavía conservándose un aspecto circunscrito en forma pseudoquística con moderada actividad macrofágica en su periferia (Fig. 38a). Entre el 6to. y 8vo. día aumentaron las lesiones focales de aspecto necrótico, con centro eosinofílico y presencia de microorganismos aislados dentro de macrófagos y células microgliales coronando estas lesiones (Fig. 38b).

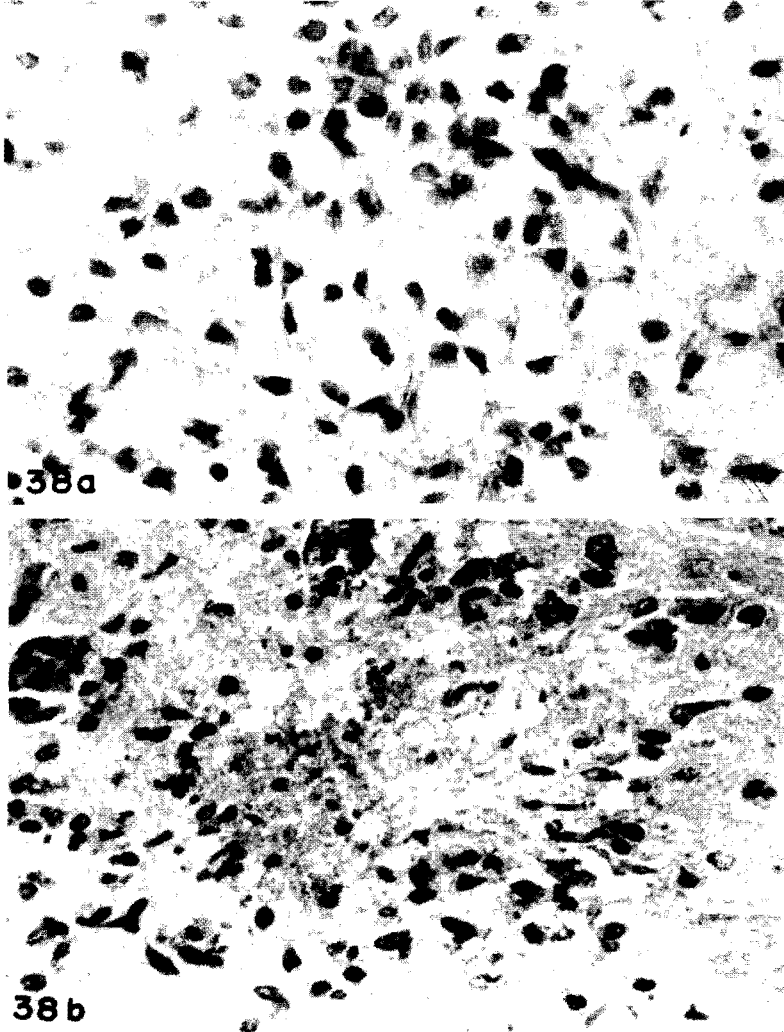


Fig. 38.— Sexto día post inoculación con el virus de la EEV. a) Foco cortical con apariencia pseudoquística que muestra fagocitos hinchados con algunos parásitos visibles en su citoplasma. 100 X. b) Necrosis eosinofílica en un área cortical. En el centro de la lesión se ven algunos parásitos libres y otros se observan dentro del citoplasma de algunos macrófagos. 100 X.

En esta etapa los focos granulomatosos mostraron una corona linfoplasmocitaria muy prominente con presencia de un número variable de células microgliales periféricas, necrosis focal en el centro y manguitos perivasculares con células mononucleares en la vecindad.

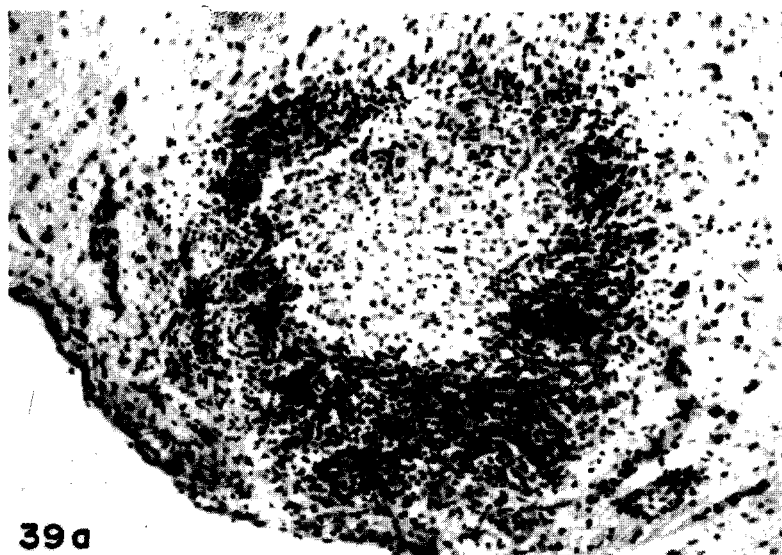
En las ratas que murieron entre los días 13 y 16 post inoculación las lesiones eran muy severas. Los cambios producidos por el virus de la EEV, descritos anteriormente eran de tipo residual, en tanto que las zonas necróticas confluían para formar abscesos con signos de inflamación aguda. Uno de estos animales mostró una meningitis aguda purulenta con signos de encefalitis necrotizante. En las ratas sacrificadas 1 mes después de la inoculación con el virus, las lesiones focales con aspecto granulomatoso eran mas frecuentes, de mayor tamaño, con gran infiltración linfoplasmocitaria coronando el centro de macrófagos epitelioides y con manguitos perivasculares con células mononucleares en la vecindad (Figs. 39a y 39b), en algunas áreas se observó microgliosis difusa en la corteza cerebral, o infiltrados con células mononucleares en las meninges. Algunos granulomas mostraban necrosis central y severa infiltración de la periferia con mononucleares y polimorfonucleares.

5. Patogenia de la infección intrauterina

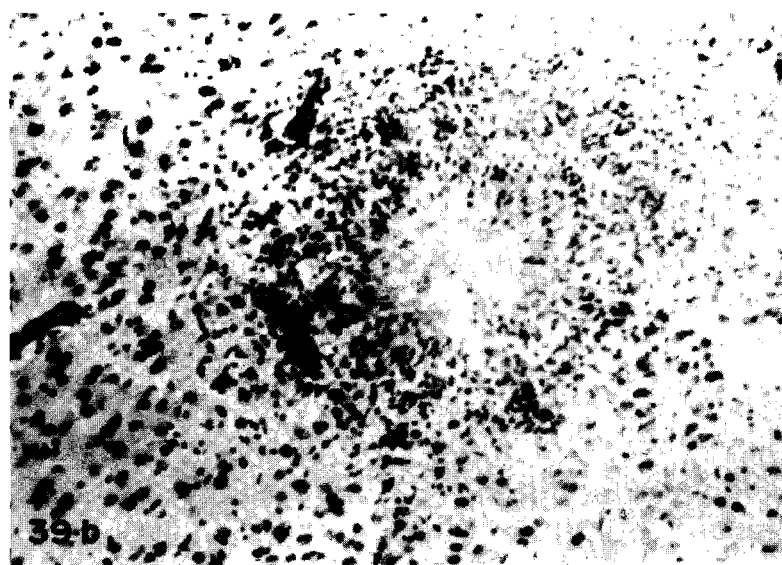
Durante la primera semana de gestación, el estudio histológico del útero de las ratas en cortes seriados practicado los días cuarto y quinto, demostró la formación del disco o placa embrionaria alrededor de la cual se vieron las células del cito y sincitiotrofoblasto. También se observaron modificaciones de los vasos de la pared uterina, engrosamiento de sus paredes, dilatación vascular y congestión.

En las ratas inoculadas con el virus de la EEV 2, 3 ó 4 días antes del 5to. día de gestación, el estudio histológico mostró necrosis focal o total con hemorragias en la placa embrionaria y vacuolización o picnosis de las células citotrofoblásticas (Fig. 40). En algunas muestras la pared del útero se encontraba infiltrada por número variable de leucocitos. A los doce días de gestación el tamaño de cada segmento del útero alcanzaba 1 cm. y el embrión sano medía 0.6 cms.; se practicaron cortes seriados para el estudio histológico de las ratas usadas como control y de las inoculadas con el virus de la EEV 2, 3 y 4 días antes del día 12 de gestación y se observaron extensas áreas de necrosis, tanto en la placenta como en el feto, especialmente los días 3ro. y 4to. post inoculación.

Durante la primera y segunda semana de gestación, las ratas inoculadas con el virus de la EEV sufrieron siempre interrupción de la preñez. En la primera semana de gestación, se examinaron los úteros en diversas etapas,



39 a



39 b

Fig. 39.— Un mes post inoculación con el virus de la EEV. a) Gran foco granulomatoso que hace prominencia en una zona cortical; en la parte central se ven células epitelioides y existe una corona linfocitaria muy evidente. 25 X. b) Granuloma cortical en área de microgliosis difusa con signos de necrosis central; infiltración periférica con abundantes linfocitos y macrófagos. 25 X.

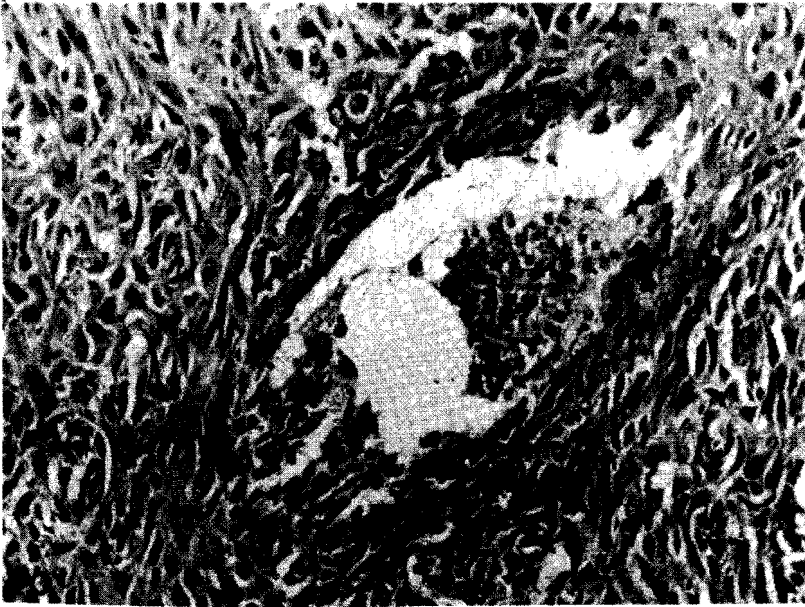


Fig. 40.— Cinco días de gestación; dos días post inoculación. Necrosis focal de la placa embrionaria. Las células son reemplazadas por detritus amorfos con aspecto granular. Algunas células del citotrofoblasto están vacuolizadas. Alrededor se ven las células fusiformes del miometrio. 100 X.

dejando en unos casos evolucionar la preñez. En estos casos se observó siempre la muerte del feto con necrosis y hemorragias del feto y de la placenta. El estudio virológico de feto y placenta en esta etapa no se pudo realizar por las dificultades para independizar el feto y la placenta en un segmento de cuerno uterino de 1 cm. En la tercera semana del embarazo, las ratas inoculadas con 200 ufp en los días 14, 15, 16, 17 y 18 de gestación fueron examinadas virológicamente e histológicamente. El estudio se realizó en diversos animales y en días de gestación variables hasta seleccionar el día 18 de gestación como la fase ideal para examinar las lesiones de la unidad feto-placentaria desde el punto de vista histológico con una correlación virológica.

Se observó que en las ratas inoculadas en los días 14 y 15 de gestación, el feto y la placenta sufrieron graves lesiones, caracterizadas por necrosis e infiltración con leucocitos polimorfonucleares. Al inocular 200 ufp el día 14 fué muy raro encontrar algún feto viable el día 18. Por el contrario llamaba la atención el hecho de que al inocular los días 15 ó 16, a pesar de que se producía muerte fetal, el daño era variable y en algunos fetos se mantenía el tamaño normal o se hallaban con vida en el momento de ser sacrificados. En estos fetos las alteraciones placentarias siempre pre-

sente, mostraban una evolución más tardía o menos severa que en los otros hijos de la misma madre. Un ejemplo de este fenómeno se muestra en la figura 41.

El estudio virológico en esta etapa del embarazo fué siempre demostrativo de que la viremia se produce entre el primer y el segundo día post inoculación. Por esta razón se hizo énfasis en el estudio virológico de fetos y placentas en los días tercero y cuarto post inoculación. Al aumentar la dosis de virus administrada de 200 a 2000 ufp fué evidente una mayor severidad de los cambios histológicos y el acortamiento del tiempo en el cual éstos se producen. En el cuadro a continuación se expresan algunos resultados del estudio virológico con 2000 ufp.

INOCULACION CON 2000 ufp, DEL VIRUS DE LA EEV,
CEPA GUAJIRA

Días de gestación	Días post inoculación	Sangre materna	Placenta	Feto
18	3	4.2×10^4	6.5×10^4	6.5×10^4
			7.7×10^4	7.7×10^4
			1.9×10^6	1.4×10^5
			8×10^5	1.6×10^5
			1.9×10^6	1.3×10^3
			2.5×10^6	8×10^2
			2.3×10^5	2.7×10^3
20	4	10^1	4.5×10^7	8×10^3
			5×10^6	5.5×10^5
21	5	10^1	2×10^7	3.5×10^3

El estudio histológico de los fetos demostró en forma constante alteraciones de tipo necrotizante que siempre se asociaron a severas lesiones placentarias. Fetos y placentas fueron siempre examinados juntos, en cortes seriados y utilizando como control fetos y placentas de ratas de la misma edad gestacional no inoculadas. Los resultados en este trabajo se orientan a la descripción de las alteraciones placentarias por considerar los cambios fetales poco específicos y atribuibles al daño de la placenta.

La reacción decidual perivascular en el miometrio fué un fenómeno evidenciable en la base de implantación de la placenta. Las células deciduales se destacan con una tinción para reticulina, que demuestra fibras alrededor de ellas y de los vasos. Desde el segundo día post inoculación se notó infiltración perivascular con leucocitos y macrófagos en la decida. En algunos vasos era evidente la necrosis fibrinoide de sus paredes



Fig. 41.— Dieciocho días de gestación; cuatro días post inoculación. Seis fetos de una misma madre con sus placentas, demostrándose en todos signos de necrosis. El tamaño del feto mas grande corresponde al normal para 18 días, pero muestra signos evidentes de muerte intrauterina y necrosis. La marca de la base de la fotografía representa 1 cm.

(Fig. 42), con distorsión de la trama reticular debida al edema y necrosis de las células deciduales (Fig. 43). En esta etapa inicial algunos vasos mostraban lesiones endoteliales y necrosis fibrinoide de la pared (Fig. 44).

Entre el tercero y el cuarto día post inoculación las alteraciones eran muy evidentes en las arteriolas. Se vieron trombos de aspecto hialino en venas a nivel de la decidua o a nivel de la placa coriónica (Fig. 45). Los vasos en la cara fetal de la placenta y las arterias umbilicales mostraron signos de vasculitis. Cuatro días después de la inoculación con el virus de la EEV, se detectaron trombos hialinos o en forma de masas fibrinoides bien organizadas en algunas arteriolas deciduales con signos de vasculitis. El examen de algunos trombos en fase de organización demostró edema del endotelio y células inflamatorias con plaquetas adheridas a la pared vascular. Las áreas de infarto placentario fueron muy evidentes entre el tercer y cuarto día post inoculación. Los infartos placentarios eran focales con pérdida de la arquitectura y modificaciones que iban desde necrosis celular individual con infiltración inflamatoria moderada (Fig. 46), a extensas zonas con necrosis de grandes segmentos de la placenta que comprometían hasta mas del 50% de la misma (Fig. 47).

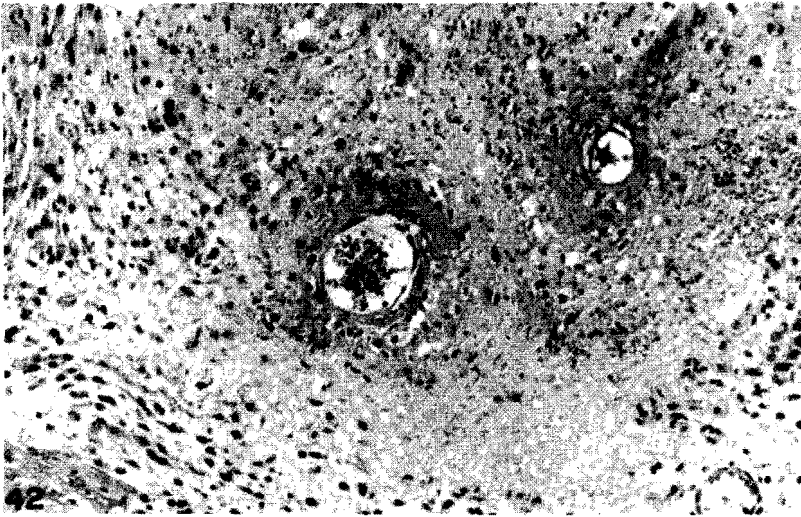


Fig. 42.— Dieciocho días de gestación; dos días post inoculación. Edema y necrosis fibrinoide de la pared vascular en el miometrio. Se observa infiltración leucocitaria. 100 X.

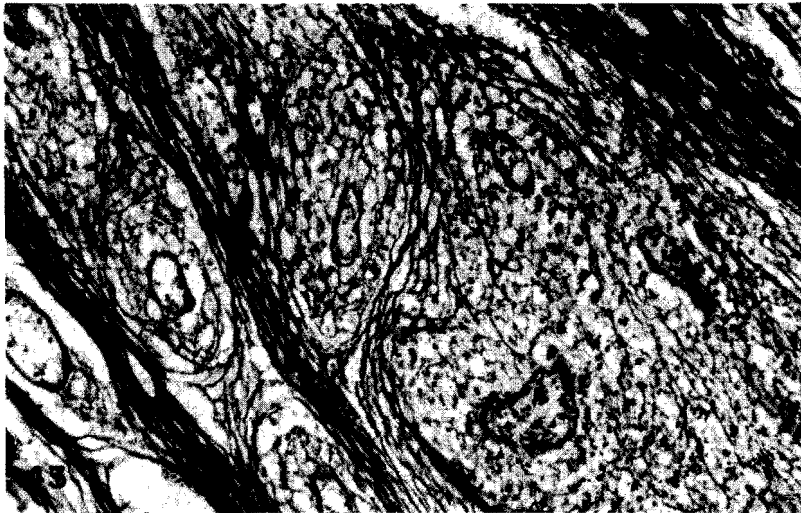


Fig. 43.— Dieciocho días de gestación; rata control. Tinción de reticulina que muestra la trama fibrilar de los vasos, constituida por las células deciduales en la pared miometrial. 25 X.

El estudio virológico de la placenta comparado con el del feto determinan siempre un título muy alto de virus (1×10^4 a 4×10^7) en la placenta, desde el segundo y tercer día post inoculación. Los títulos en el feto

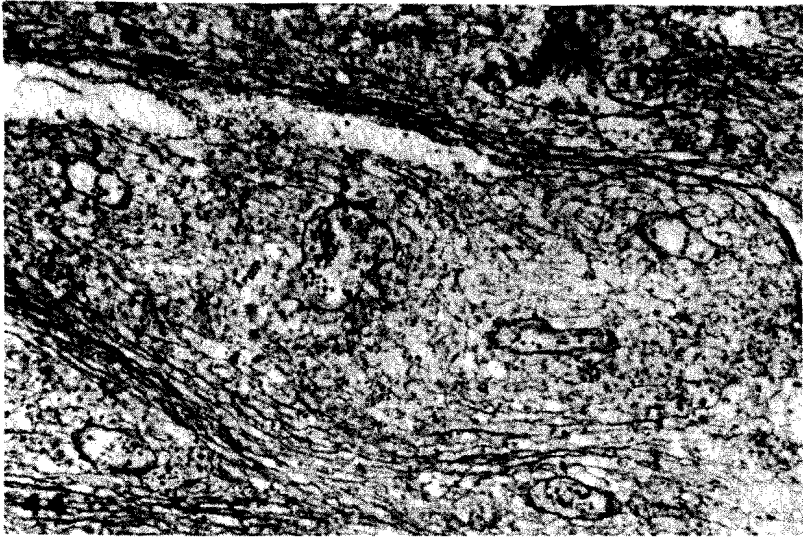
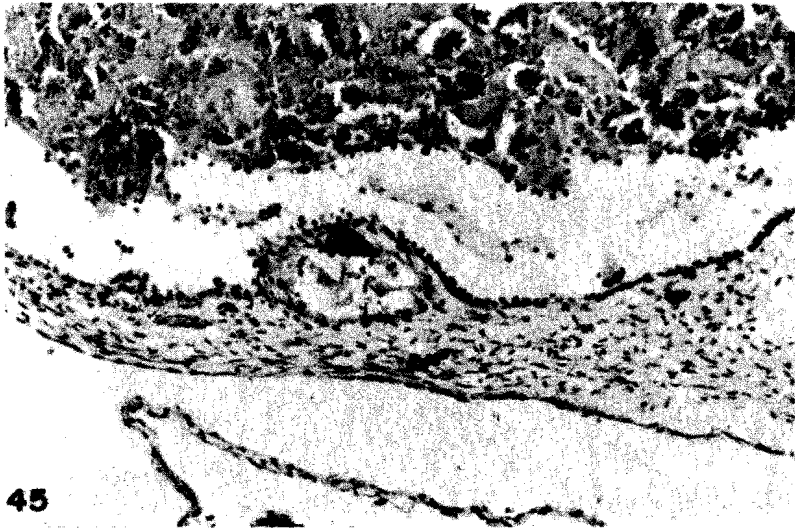


Fig. 44.— Dieciocho días de gestación; dos días post inoculación. Distorsión de las fibras perivasculars de reticulina producida por el edema, necrosis e infiltración de las células deciduales por leucocitos. 25 X.



45

Fig. 45.— Dieciocho días de gestación; cuatro días post inoculación. Trombo hialino en una vena de la placa coriónica. 100 X.

fueron siempre menores que los placentarios y tendían a crecer después del tercer día post inoculación.

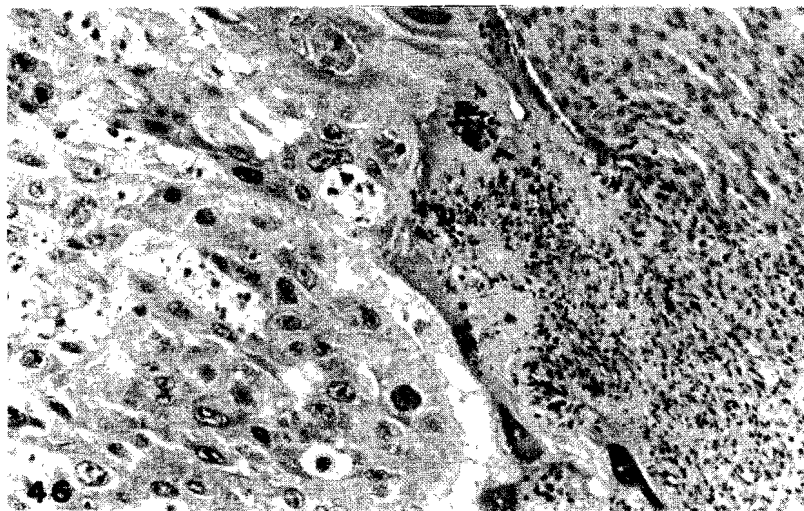


Fig. 46.— Dieciocho días de gestación; cuatro días post inoculación. Trofoblastos y decidua con signos de necrosis e inflamación. 100 X.

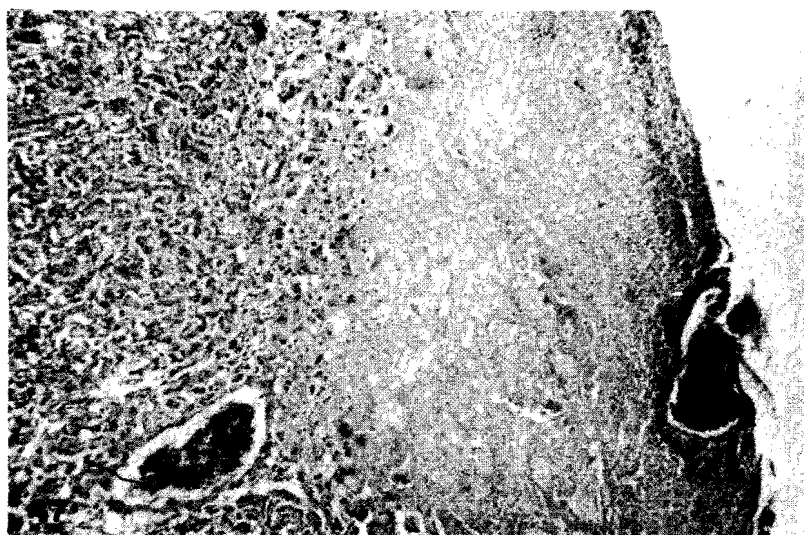


Fig. 47.— Gran infarto placentario. Todavía se pueden detectar las vellosidades coriales en la zona de necrosis. 25 X.

La viremia de las ratas inoculadas por vía ip con el virus de la EEV, se caracteriza por ascender haciendo un pico en el rango de 10^6 ufp x ml al segundo día post inoculación. Al tercer día los valores decaen en el orden de 10^4 ufp x ml.

El ascenso del título de virus en las placentas entre 10^4 a 10^6 ufp x gr al tercer día y entre 10^5 a 10^7 x gr al cuarto día post inoculación, fué comparada con los títulos en los fetos respectivos, los cuales variaron entre 10^4 y 10^5 ufp x gr.

DISCUSION

Experimento en ratones: ultraestructura e histoquímica

La morfogénesis de las partículas del virus de la EEV en el cerebro de ratones recién nacidos inoculados intracerebralmente con este virus, fué descrita en nuestros trabajos del año 1971 (47, 48). En este estudio se señalarán algunos detalles que no han sido previamente discutidos o que es necesario actualizar en base a nuevas contribuciones, sobre todo en el campo de la estructura fina de las partículas virales y su estudio con el ME en cortes finos y con tinción negativa. Se reportarán una serie de investigaciones originales, las cuales considero deben contribuir a despertar el interés sobre este tema y espero que puedan ampliarse en estudios conjuntos de tipo bioquímico e inmunológico.

Cuando se examinan las micrografías electrónicas del cerebro de los ratones inoculados con el virus de la EEV, la proliferación de los complejos de Golgi y la organización de las masas de material granular en el citoplasma de las células nerviosas es el primer aspecto que amerita una breve consideración. En los resultados de este trabajo se demuestra como se inicia la formación de material granular, entre los grupos de polirribosomas que aún no se han modificado, en ratones inoculados intracerebralmente con el virus, tan solo 16 horas después de la inoculación. Ya señalaba en 1971 (47) que estas áreas granulares se van haciendo mayores y como alrededor de ellas se ven partículas de 28 a 30 nm de diámetro, que se consideran precursores virales o nucleocápsidos (NC). La posibilidad de que estas masas granulares representan áreas de viroplasma o fábricas de virus ha sido discutida (47), y se han señalado algunos datos que hacen que las observaciones reportadas previamente (47, 48), y las señaladas en este trabajo estén en desacuerdo con los hallazgos sobre la formación inicial de las partículas del virus de la selva de Semliki (SF) a nivel de membranas celulares (43, 65). Por este motivo es importante discutir en esta primera parte las implicaciones del viroplasma y de las membranas de las células infectadas en la formación de las partículas del virus de la EEV.

Cuando se iniciaron los estudios sobre la morfología de los arbovirus, se demostraron con el ME partículas redondeadas consideradas como precursores de los virus y las cuales corresponden a los NC. La interpretación sobre el origen de los NC y su papel en la formación de las partí-

culas virales fue en un principio contradictoria (106, 111), si bien siempre coincidía en el hecho de que las partículas virales se ensamblaban en la membrana plasmática de la célula infectada. Sin embargo, como se señalaba antes, los estudios realizados con el virus SF en células cultivadas, durante las etapas más tempranas de la infección, sugerían que, además de la membrana plasmática, también ciertas vacuolas del citoplasma eran los sitios de síntesis de proteína viral (43, 65). En este trabajo se reporta la presencia de vacuolas similares a las descritas por Friedman (43, 45) y Grimley (65, 67) en el citoplasma de macrófagos a nivel del bazo, en los ratones durante las primeras 48 horas después de la inoculación intracerebral con el virus de la EEV. Posteriormente comentaré algunos detalles sobre estos hallazgos. En trabajos sobre la ultraestructura e histoquímica del tejido nervioso durante el desarrollo del virus de la EEV (47, 48) fue demostrado como los NC parecían formarse en masas de material granular en el citoplasma de las células nerviosas y posteriormente describí observaciones similares a nivel del músculo cardíaco (51). Estas "fábricas de virus" o viroplasmas habían sido descritas por Bykosky en células cultivadas infectadas con el virus de la EEV (23) y por Lascano en el cerebro de ratones inoculados con el virus Aura (93). En esa época Higashi describió por medio de la autoradiografía, la presencia de ARN y de proteínas en estructuras similares al "viroplasma" descritas durante la infección con el virus Chikungunya (72). Todas estas evidencias morfológicas me llevaron a postular la teoría de que el virus de la EEV se podía originar en masas de material granular que se sitúa en el citoplasma y que es similar a las masas de viroplasma descritas en otras infecciones virales como la rabia (50) o en la infección con el virus de la fiebre de las garrapatas de Colorado (107). Posteriormente Murphy, aceptando esta hipótesis, propone el viroplasma dentro de la descripción de la morfología y morfogénesis del virus de la EEV (109).

En los primeros estudios con el ME sobre el desarrollo del virus de la encefalitis equina del oeste (EEO), realizados por Morgan en 1961 (106), no se observaron suficientes figuras de gemación como para aceptar definitivamente que los NC incorporan la membrana celular para transformarla en envoltura viral. Las primeras observaciones sobre el virus de la EEV describían una etapa de migración citoplasmática con liberación en la membrana plasmática que no dejaba en claro cual era el mecanismo de formación de los viriones (111). No fué sino hasta 1967 cuando Acheson y Tamm (1) y también Erlandson (40), demostraron que la maduración de los NC del virus SF se hace a nivel de las membranas y que el virus deja las células por un mecanismo de pinocitosis invertida o gemación. Sin embargo, todavía no estaba claro el papel del NC de los togavirus en relación con la membrana de vacuolas o cisternas citoplasmáticas, pues como señalaba Erlandson, la gemación dentro de vacuolas debería ser un proceso

muy rápido pues no se veían casi formas de transición (40). En estos años, algunos estudios le adjudicaron una singular importancia al retículo endoplasmático en la formación de partículas virales, sobre todo en arbovirus que no pertenecían al grupo A, como la fiebre amarilla (16), West Nile y Guaroa (148), Encefalitis Japonesa B (159), o en arbovirus del grupo A como EED (106), Aura (93) y SF (44). En nuestras observaciones con el ME sobre el virus de la EEV, no se describió ninguna relación entre el retículo endoplasmático y las partículas virales (48, 51) y tampoco describo en este trabajo ninguna modificación al respecto.

En lo que se refiere a la incorporación de la membrana celular por los NC, los estudios con el virus Chikungunya (71) en 1967 y posteriormente con el virus Sindbis en 1973 (123), utilizando anticuerpos marcados con ferritina, demostraron que el ensamblaje de las partículas virales se hace en la membrana celular. Sin embargo, en estos estudios no se observaron imágenes de gemación en las vesículas citoplasmáticas ni en las cisternas de las células.

La importancia del aparato de Golgi en la formación de las partículas del virus de la EEV fue sugerida desde 1962 por Nuñez Montiel (117) y posteriormente Lascano en la infección con el virus Aura (93). Grimley y Friedman en 1970 demostraron hallazgos similares en el cerebro de ratones infectados con el virus SF (66). Al año siguiente, mis trabajos sobre el desarrollo del virus de la EEV en ratones recién nacidos (47, 48), dejaron finalmente aclarado el papel del aparato de Golgi y sus membranas lisas en la formación de las partículas virales. Ese mismo año, Holmes destacó la importancia del aparato de Golgi en la morfogénesis de las partículas virales de varios arbovirus del grupo Bunyanwera (73).

A la luz de conocimientos recientes sobre la estructura físico-química de la envoltura de los togavirus, y de nuestras investigaciones con el ME sobre la incorporación de la membrana celular para formar la envoltura del virus de la EEV, es posible señalar detalles de este fenómeno que no han sido previamente reportados. Tal vez una de las observaciones más interesantes es la referente al papel de las espículas en la superficie de las partículas virales durante su ensamblaje y la posibilidad de estudiarlas con el ME. Se sabe que las espículas de los togavirus están compuestas por dos glicoproteínas E1 y E2 (56, 136). También se demostró la existencia de otra glicoproteína E3 en la envoltura del virus SF (56). Una de las interrogantes que deben plantearse a nivel ultraestructural es la de en qué momento la membrana de la célula infectada por el virus de la EEV comienza a transformarse en envoltura viral. No se sabe si esto ocurre antes de que el NC se ponga en contacto con la membrana o si el genoma viral puede influenciar a distancia la organización estructural de las membranas.

El fenómeno no ha sido completamente esclarecido pero se han hecho importantes contribuciones sobre la composición físico-química de los togavirus que ayudan a comprenderlo (88). Cuando señalamos en los resultados como el NC entra en contacto con las membranas, especialmente las membranas lisas del complejo de Golgi para producirse la gemación, es posible observar cambios en la estructura fina de las membranas. Se ha propuesto que las glicoproteínas se difunden lateralmente en la membrana celular (94), factibilidad que hace posible el modelo del mosaico lipídico-fluido de Singer (139). Posteriormente los estudios de Bachi y cols. (12) demostraron que era posible marcar con ferritina los sitios de actividad antigénica en la membrana de los eritrocitos unidos por efecto del virus Sendai y con la aplicación del método de crio-fractura fué posible visualizar estas áreas con el ME. Los trabajos de Tillack (146) en membranas de eritrocitos y el esquema de Singer (139) son fundamentales para interpretar las modificaciones de las membranas celulares inducidas por el virus de la EEV.

La envoltura de los togavirus ha sido cuidadosamente estudiada y se sabe que ella no difiere mucho de la organización estructural y bioquímica de las membranas de la célula que reproduce las partículas virales (32, 125, 133). Por otra parte, se ha propuesto que las proteínas del NC no hacen protusión en la envoltura (69). Las proteínas capsoméricas de los togavirus son similares y ésto lo demuestran estudios con los virus Sindbis (144) y SF (57); sin embargo, por estudios sobre la composición proteica del cápsido del virus de la EEV realizados por Horzinek (76), se sabe que ésta difiere considerablemente de lo que se ha descrito para otros togavirus (57, 76, 144). Una opinión similar en lo que se refiere a las diferencias entre la estructura y composición proteica del cápsido del virus de la EEV es sostenida por José Esparza, del Laboratorio de Virus Animales del IVIC (Comunicación personal), basándose en estudios preliminares sobre la separación de proteínas de las partículas del virus de la EEV. De aquí que sea de gran interés el poder estudiar las propiedades físico-químicas y la estructura del virus de la EEV y compararla con la de los otros togavirus como SF o Sindbis, ya que éstos se han utilizado como moldes para incluir a los demás virus, que antes se agrupaban en el grupo A de los arbovirus, y ahora se reúnen en un solo grupo denominado grupo alfa de los togavirus.

Es lógico suponer que debe existir una cierta relación estructural entre las proteínas del cápsido y las glicoproteínas que forman las espículas en la envoltura viral. Estudios realizados por Burke y Keegstra (21) señalan que la glicoproteína E1, la cual se sabe posee las propiedades hemaglutinantes (31), atraviesa la envoltura y la glicoproteína E2 debe estar conectada con el NC de alguna manera, aunque no se sabe como se produce esta asociación. Las dificultades para separar las glicoproteínas E1 y E2

han sugerido que ellas están unidas por puentes y se piensa que éstos no son puentes disulfídicos ya que durante la purificación no se reducen. Estos puentes mantendrían a las glicoproteínas E1 y E2 en la cubierta del virus con una separación estructural precisa. Los estudios de Von-Bonsdorff y Harrison⁽¹⁵³⁾ también señalaban que en la superficie del virión las espículas mantienen una estructura icosaédrica, formando una especie de malla que cubre al virus y éste contribuye a confirmar la impresión de que la organización arquitectónica de las glicoproteínas en la envoltura viral se rige por patrones estructurales muy precisos.

Garoff y Simons⁽⁵⁷⁾ han demostrado que las colas hidrofóbicas de las glicoproteínas E1 y E2 penetran a través de la doble capa lipídica de la envoltura viral y proponen que las conexiones de estas con el cápsido van a determinar la organización definitiva de la envoltura viral sobre el cápsido.

Observaciones sobre la morfología del virus Sindbis utilizando el método de crío-fractura han demostrado subunidades de 4 nm de diámetro con espacios de 6 nm entre ellas en la superficie de la partícula viral y se han considerado como una evidencia de la organización espacial de las espículas de la envoltura⁽¹⁹⁾. También se ha demostrado, marcando aminoácidos y glicoproteínas con material radioactivo, que la extracción de lípidos del virus Sindbis utilizando SDS, deja un 60% de las glicoproteínas en su posición habitual sin mayores modificaciones en la estructura del virión⁽²⁰⁾. Estos resultados señalan nuevamente que existe una relación estructural entre las proteínas del nucleocápsido y las de la envoltura.

Al presentar los resultados del estudio del cerebro de los ratones recién nacidos inoculados con el virus de la EEV, señalé que era posible detectar una cierta organización de los nucleocápsidos en cortes ultrafinos. La comparación entre estos hallazgos y las observaciones con tinción negativa de la envoltura viral demuestran una regularidad arquitectónica que puede disociarse en subunidades como las que obtuvimos al tratar al virus purificado por DOC⁽⁵³⁾, y semejantes a las ya descritas en los resultados de este trabajo. Sin duda alguna es necesario practicar estudios con ME de mayor resolución y combinar estas observaciones con datos bioquímicos o inmunoquímicos.

En la descripción de los resultados destacué la importancia de las espículas del virus de la EEV en el fenómeno de asociación entre las partículas virales y como alrededor de los axones o en el espacio extracelular en el SNC, las partículas virales se agrupaban en forma paracristalina o linealmente, pudiendo demostrar con el ME como las espículas se unían formando puentes entre los viriones. A pesar de las observaciones hechas

por Murphy y Whitfield sobre la imposibilidad de ubicar la forma de las espículas del virus de la EEV en cortes finos⁽¹⁰⁸⁾, si creo factible demostrar a nivel de los cortes ultrafinos en el SNC de ratones que las partículas del virus de la EEV muestran una organización precisa y regular de sus espículas. Los resultados del estudio descrito en este trabajo señalan algunas de estas evidencias. Posteriormente cuando se discuta la morfología de la envoltura viral examinada con tinción negativa, comentaré algunos aspectos sobre la fusión de partículas virales por puentes de anticuerpos, lo cual se relaciona con la visualización mas evidente de las espículas cuando ellas están en contacto con el plasma sanguíneo, fenómeno muy característico observado a nivel ultraestructural en la parte 1.3⁽⁶⁾ en este trabajo. También mas adelante, al discutir la morfología de las hemaglutininas separadas por la acción del DOC y examinadas con tinción negativa, señalaré algunos aspectos sobre la organización de estas partículas a nivel ultraestructural y sobre la necesidad de estudiar, desde el punto de vista físico-químico las glicoproteínas de superficie del virus de la EEV.

En el estudio ultraestructural de los tejidos en los ratones recién nacidos inoculados intracerebralmente con el virus de la EEV, he señalado algunos detalles sobre los macrófagos. Los hallazgos reportados en macrófagos libres y en las células del sistema retículoendotelial del bazo y del hígado, merecen una breve consideración. Existen estudios demostrando la importancia de las células de Kupffer en la fagocitosis de las partículas del virus de la EEV⁽⁸⁴⁾. También se ha señalado que el bloqueo del sistema retículoendotelial con Thorotrast aumenta la letalidad de las cepas menos virulentas del virus de la EEV⁽⁸²⁾. La presencia de nucleocápsidos y de vacuolas citopáticas en las células reticulares del bazo y en algunos macrófagos, demostrados en nuestros resultados, son similares a las descritas en células cultivadas como los sitios iniciales de la replicación en infecciones con arbovirus⁽⁶⁵⁾. Este hallazgo sugiere que en estas células se están replicando activamente los virus de la EEV, posiblemente por un mecanismo similar al descrito en células cultivadas^(45, 65, 67). En este tipo de vacuolas no se ven partículas virales pero se sabe por autoradiografía que ellas son el sitio de replicación viral⁽⁶⁷⁾. Es necesario destacar que en el tejido nervioso ocasionalmente se vieron protusiones globulares de apariencia similar a las descritas por Grimley y Friedman^(44, 45, 65, 67) en la membrana plasmática de neuronas infectadas por el virus de la EEV, y este hallazgo es descrito en los resultados de este trabajo. Todos estos resultados parecen señalar que el sistema retículoendotelial es activamente infectado por el virus de la EEV en los ratones recién nacidos.

La relación entre los macrófagos libres y la necrosis tisular parece evidente si consideramos la frecuencia con que se observa al ME material fagocitado en el citoplasma de estas células. La presencia de material ne-

crótico intracelular reportado en este trabajo, ya ha sido destacado por Gorelkin y Jahrling en 1974⁽⁶²⁾, quienes describieron este fenómeno ocurriendo a las 62 horas de haber inoculado subcutáneamente el virus de la EEV en hamsters^(10, 83, 126), y este fenómeno que se cree influye en la respuesta celular^(10, 36, 62) es también responsable del aumento de restos celulares necróticos que deben ser fagocitados por los macrófagos. Es interesante destacar que Negrette describió en 1960⁽¹¹³⁾ vacuolas en los leucocitos de frotis sanguíneos durante las infecciones virales y que el mismo autor, posteriormente demostró vacuolas en los leucocitos durante la infección con el virus de la EEV en humanos⁽¹¹⁵⁾. Cuando se ha revisado el papel de los macrófagos en la infección con el virus de la EEV, se les confiere una doble función; por una parte la fagocitosis de partículas virales y por la otra el percibir la influencia que leucocitos inmunológicamente activados ejercen sobre estos macrófagos para contener la multiplicación del virus⁽¹²⁴⁾. Estos aspectos relacionados con la respuesta celular ante la infección con el virus de la EEV, serán examinados mas adelante al discutir los hallazgos histológicos en el bazo y el cerebro en ratas inoculadas intraperitonealmente con el virus de la EEV.

También es importante discutir el papel del endotelio vascular en la infección con el virus de la EEV, ya que durante la viremia tan elevada circulan innumerables partículas virales en el torrente sanguíneo. En este momento mencionaré la ausencia de alteraciones en las células endoteliales de los ratones; este hallazgo que ya fue señalado en 1971^(47, 48) y en 1973⁽⁵¹⁾ en mis trabajos sobre el virus de la EEV, contrastaba con la abundancia de partículas virales descritas en los órganos mas vascularizados como el pulmón, hígado, riñón y bazo en la fase inicial de la infección con el virus de la EEV⁽¹⁴⁵⁾. Es un hecho conocido que existe una fase visceral en la infección por el virus de la EEV que precede a los fenómenos encefalíticos⁽¹⁴⁵⁾ y este hecho ha sido reportado también en otras infecciones con arbovirus, como fiebre amarilla⁽¹⁰⁵⁾ y encefalitis equina del este⁽⁷⁹⁾.

En este trabajo se demuestra la indemnidad del endotelio en la infección con el virus de la EEV en ratones recién nacidos. Estos hallazgos fueron descritos en 1971^(47, 48) y contrastan con las observaciones reportadas por Johnson en 1965 con el virus Sindbis⁽⁸⁶⁾, y posteriormente por Gorelkin en 1974 con el virus de la EEV⁽⁶¹⁾, aunque debe notarse que ambos estudios habían sido realizados en ratones adultos. Se ha propuesto que el endotelio es uno de los primeros sitios de replicación viral^(61, 86), sin embargo, de acuerdo a mis observaciones previamente reportadas^(47, 48, 51) y a los hallazgos descritos en este trabajo, el papel del endotelio en la infección con el virus de la EEV es inminentemente pasivo. Observaciones similares fueron descritas por Murphy y Whitfield con el virus de

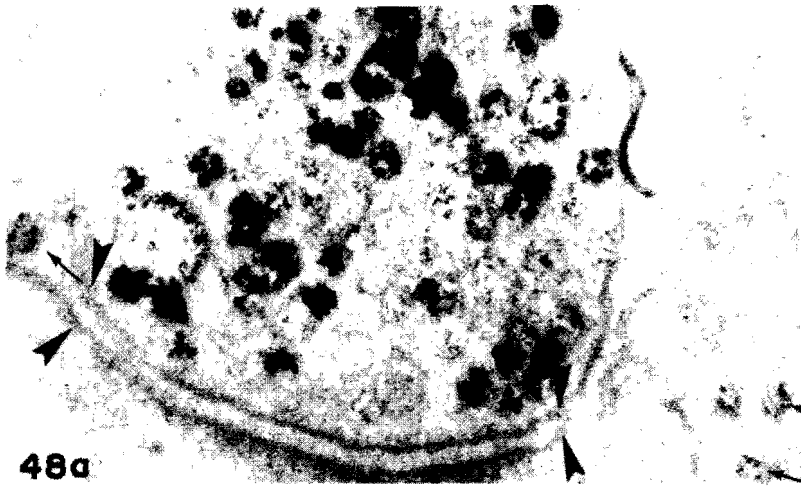
la encefalitis equina del este (108) y por Rodríguez en hamsters inoculados con el virus de la EEV (126). En 1974 Gorelkin cita nuestros hallazgos sobre el paso de partículas virales a través del endotelio en vesículas pino-citóticas, denominando citopempsis al fenómeno y considerándolo como un mecanismo de bombeo a través de la pared vascular (62). Ese mismo año Pathask y Webb en Inglaterra hacen consideraciones similares sobre el transporte del virus SF en el cerebro de ratones (121). Al año siguiente Rodríguez se refiere de nuevo a nuestras observaciones proponiendo esta vía trasendotelial como la de mayor importancia en la penetración de las partículas del virus de la EEV para infectar el páncreas (127). Vale la pena que señale aquí la importancia de la escasa maduración de la barrera hemoencefálica en los ratones recién nacidos y el valor de este hecho en la facilitación de la penetración del virus en el sistema nervioso. La importancia de este hecho en relación con la producción de lesiones cerebrales in-útero amerita que se estudie mejor el efecto del virus sobre el tejido nervioso de fetos o embriones, sobre todo por el conocimiento que existe de que el virus de la EEV ha provocado necrosis cerebral en fetos nacidos de madres que habían padecido de encefalitis equina durante el embarazo (156). Estos hallazgos me han llevado a plantear un modelo experimental en ratas, para la provocación de lesiones cerebrales in-útero el cual será discutido en la última parte de este trabajo.

En el pulmón de los ratones demostré la presencia de partículas virales en los vasos y en la superficie de algunas células bronquiales sin que se observaran signos de replicación en el epitelio ni en el endotelio, destacándose el compromiso de las células mesenquimáticas del intersticio pulmonar en los fenómenos de multiplicación del virus. Con respecto a estos detalles sobre la replicación del virus en el miocardio, se debe añadir a lo ya reportado en 1973 (51), que existen evidencias de la importancia del aparato de Golgi y de las cisternas del retículosarcoplasmático en la formación de las partículas virales. La importancia de haber demostrado que el virus de la EEV es capaz de multiplicarse en el miocardio fué mayor, por la relación que este hallazgo podía tener con alteraciones del electrocardiograma reportadas durante la vacunación con el virus de la EEV (4) y en las lesiones descritas en el corazón en un caso humano de EEV (39). El papel del músculo estriado en la fase aguda de la infección con arbovirus ha sido examinado durante la infección con los virus Roos River y SF (110) y las evidencias de este estudio señalan que, efectivamente el papel del tejido muscular estriado del miocardio, de la grasa parda y de otros tejidos mesenquimáticos en la replicación de los arbovirus en fases tempranas de la infección, es muy importante.

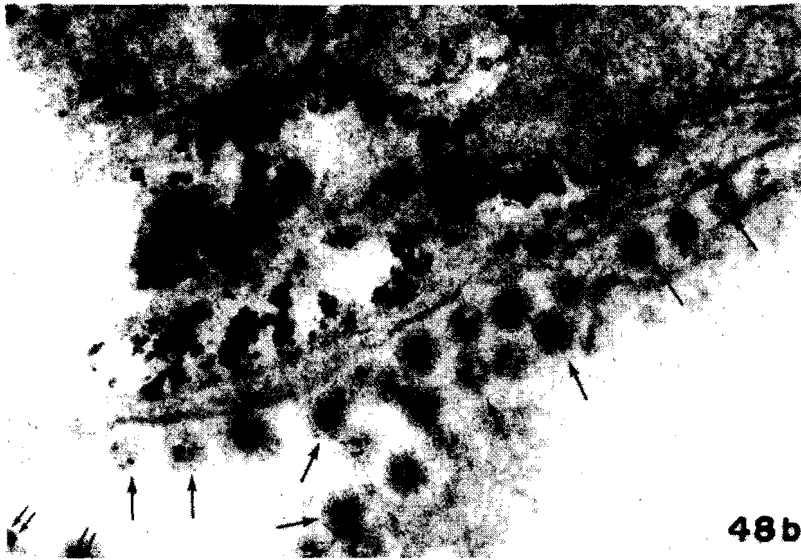
Finalmente debo añadir algunos comentarios sobre los hallazgos histológicos que fueron parcialmente reportados previamente (47, 48), y que

contribuyen a valorar la patogenia de las lesiones tisulares durante la infección con el virus de la EEV.

La fosfatasa ácida es una enzima hidrolítica que ha sido utilizada para demostrar la actividad del sistema lisosómico de las células. Esta enzima se origina a nivel de los ribosomas y migra por el retículo endoplasmático para concentrarse en el aparato de Golgi (33, 116). Este hecho hace que parte de los resultados que se presentan en este trabajo señalando la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el retículoendoplasmático y en la cisterna perinuclear deban ser interpretados como un exceso de producción de la enzima a nivel de los ribosomas. Esta localización de los depósitos de plomo que marcan la actividad de la fosfatasa no es común. Si bien los argumentos de De Duve y Novikoff sobre el origen de la enzima en los ribosomas son firmes, éstos se basan en el origen proteico de la misma y no en su ubicación por medio de métodos histoquímicos a nivel ultraestructural. Considero que, tal y como se planteó en 1971 (48), hay un incremento en la actividad de la fosfatasa ácida evidenciable a nivel de las áreas de necrosis celular, a nivel de las cisternas proliferadas de los aparatos de Golgi y en general en los sitios donde en células aún no alteradas se estaba replicando el virus de la EEV. Pero mas interesante aún es el poder decir que la producción de esta enzima parece haber sido aumentada por las células nerviosas puesto que hay evidencias que señalan su presencia a nivel de la cisterna perinuclear y del retículo endoplasmático rugoso de las neuronas. Cuando se demostró que las enzimas lisosómicas eran capaces de visualizarse en las células e intervenir en los cambios necrotizantes como consecuencia de infecciones virales (6, 97), se pensó que éste era un mecanismo de protección celular para destruir las proteínas virales. En estudios posteriores demostramos como en la rabia paralítica bovina, los lisosomas neuronales a nivel de la médula espinal parecen dirigirse hacia las áreas de viroplasma para rodear los sitios de formación del virus de la rabia (52). Queda por aclararse, si realmente el genoma viral es capaz de inducir un aumento de producción de esta u otras enzimas a nivel de los ribosomas. Este campo de estudio, citoquímica a nivel ultraestructural, ha sido examinado muy superficialmente y creo que la aplicación de métodos histoquímicos a los estudios que se realizan con el ME, puede aportar importantes contribuciones para comprender mejor la patogenia de las alteraciones tisulares que se producen en las infecciones virales. Creo de interés en este momento destacar algunos experimentos sobre la actividad de ATPasa, realizados en los tejidos de ratones recién nacidos inoculados con el virus de la EEV y cuyos resultados no son presentados en este trabajo. La aplicación del método de Wachstein y Meisel al estudio ultraestructural, demostró la presencia de depósitos de plomo que marcan la actividad de ATPasa en el interior de las partículas del virus de la EEV (Fig. 48). La incorporación de la membrana celular durante el fenómeno de gemación



48a



48b

Fig. 48.— Demostración de la actividad de ATPasa en el tejido nervioso de ratones recién nacidos inoculados con el virus de la EEV. Las cabezas de flechas en la figura a, señalan una hendidura sináptica y se observa la intensa actividad de ATPasa en las vesículas presinápticas. Las partículas del virus de la EEV muestran depósitos de plomo que marcan la actividad de la enzima en su parte central dejando claramente visible la envoltura (flechas simples). La doble flecha en el extremo inferior de la figura b, señala depósitos de plomo en la hoja externa de la membrana plasmática y en el interior de una partícula que está saliendo al espacio intercelular por gemación. Se utilizó el método de Wachstein & Meisel aplicado para ME para detectar la actividad de ATPasa. 125.000 X.

nos hizo pensar que los depósitos de ATPasa se deberían encontrar en la superficie de la envoltura viral, pero el hallazgo contradictorio sólo nos puede sugerir que se produce una modificación de la organización estructural de las proteínas y en particular de las enzimas que posee la membrana celular, durante el proceso de gemación. Si éste es el caso, quedaría por verse hasta que punto el genoma viral influencia este arreglo, o si son cambios que se dan en la membrana inespecíficamente siguiendo los patrones de movilización en la bicapa lipídica de acuerdo con el modelo de Singer (139). La imposibilidad para responder a estas preguntas ha hecho que estos resultados no se incluyan en el trabajo actual, pero los comento por el interés que puede despertar en algún investigador, tanto para comprender mejor la arquitectura del virus como para examinar en detalle las modificaciones de las membranas bajo la acción de los virus.

Examen de la arquitectura del virus por el método de tinción negativa

a) **Envoltura.** En la discusión sobre la estructura del virus en cortes ultrafinos señalaba la asociación entre las partículas virales a través de sus espículas de superficie, las cuales se unían formando mallas y se indicaba que esas espículas eran más evidentes cuando los viriones se hallaban en presencia de plasma sanguíneo. En las preparaciones del virus de la EEV purificado examinado con tinción negativa e igualmente al examinar las fracciones hemaglutinantes de los gradientes tratados con DOC, fué posible detectar con claridad las espículas en la superficie de las partículas virales y en las envolturas alteradas por el efecto del DOC. Resultados similares han sido reportados con el virus de la EEV (49, 53, 74) y con otros arbovirus (24, 75, 110, 138, 152). Cuando las partículas del virus de la EEV purificado se pusieron en contacto con suero rico en anticuerpos anti-EEV y se examinaron con tinción negativa, la observación de finos filamentos que unían los virus fueron similares a las reportadas con otros virus al entrar en contacto con anticuerpos (7, 77, 140).

De manera general se acepta que las espículas que se observan en la superficie de las partículas virales corresponden a determinantes antigénicos y que los anticuerpos se van a fijar a estas espículas. En este sentido se ha utilizado la tinción negativa de partículas virales para relacionar la fusión de las partículas con el tamaño de las moléculas de anticuerpos en conejos, antes (68) y después de que éstas se peguen a la superficie de los virus polioma y papiloma (8). Estos hallazgos parecen indicar que las espículas del virus de la EEV no solamente corresponden a las hemaglutininas sino que están formadas por glicoproteínas cuyas propiedades antigénicas dependen de la organización de las proteínas del nucleocápsido.

Por este motivo es interesante señalar la importancia de las uniones que se pueden ver con el ME, entre las partículas del virus de la EEV a

través de sus espículas. Este fenómeno ya fué señalado en cortes ultrafinos y amplía el concepto que se emitió anteriormente al mencionar la fusión de las partículas virales en presencia de suero con anticuerpos. Experimentos hechos con Slavia y Elena Ryder, del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Universidad del Zulia, utilizando suero de un paciente con altos títulos de anticuerpos contra EEV (resultados no publicados), revelaron que las muestras correspondientes a las fracciones séricas de unidades 19s y 7s separadas por ultracentrifugación, al ser puestas en contacto con virus de la EEV purificado, mostraron fusión de las partículas virales por puentes semejantes a los denominados "puentes de anticuerpos" (7, 77) y que éstos fueron mas evidentes en la fracción que mostraba las unidades (19s).

b) **Nucleocápsido.** La estructura capsomérica de los togavirus han constituido otro problema de difícil solución. Por una parte la existencia de una envoltura lipoproteica enmascara el nucleocápsido (NC) y por otro lado la uniformidad esferoidal del mismo hace que sea difícil demostrar su organización submicroscópica. Los primeros estudios con el ME sobre el virus de la EEV se realizaron en el IVIC (111). Posteriormente estudios con el virus de la selva de Semliki (SF) (119) y con otros arbovirus (13, 138) no pudieron inicialmente demostrar una estructura capsomérica coherente. Horzinek y Mussgay (75) propusieron un modelo estructural para el cápsido del virus Sindbis después de desnudarlo de su envoltura por medio de purificación en gradientes de sacarosa y tratamiento con DOC. Los resultados de nuestras investigaciones sobre el virus de la EEV, reportados en 1972 (49) y 1974 (53) y las observaciones señaladas en este trabajo nos demuestran que el cápsido del virus de la EEV tiene una simetría icosaédrica, con una arquitectura capsomérica similar a la descrita para virus Sindbis (75), Semliki Forest (151) y el virus Banzi (24). Sin embargo, estos estudios no ofrecen medidas idénticas para las subunidades capsoméricas: de 12 a 14 nm para el virus Sindbis (75), de 7 a 8 nm para SF (151), y en el estudio con tinción negativa que presentamos en este trabajo demuestra capsómeros entre 10 y 12 nm de diámetro. Es difícil aplicar los postulados sobre los virus cúbicos propuesto por Gaspar (58) ya que podemos considerar un esquema de 92 unidades donde se verían unidades de 5 y 6 lados organizados en forma coordinada (forma icosadeltaedra) de 36 nm de diámetro, con capsómeros de 7 nm de diámetro o un modelo de 32 unidades capsoméricas donde cinco subunidades estarían rodeadas por otras cinco subunidades en forma hexagonal. Estas medidas han sido propuestas para el virus Sindbis con un NC de 32 nm de diámetro formado por subunidades de 14 nm, organizadas en forma icosaédrica (75). Estudios con el virus Sindbis utilizando el método de crio-fractura sugieren sin embargo, el primer esquema para ubicar el tamaño de su NC (19). Las micrografías electrónicas que muestran las subunidades capsoméricas disociadas permi-

ten destacar la estructura y medidas de estos capsómeros en el virus de la EEV, señalando que no deben confundirse con las estructuras anulares descritas por nosotros en este trabajo en la fracción hemaglutinante del gradiente tratado con DOC, sobre las cuales discutiremos su significado mas adelante.

Un efecto similar al observado en las preparaciones del material tratado con DOC relativo a la disociación de las subunidades capsoméricas se puede lograr modificando el pH de la solución que contiene el virus o tratándolo con sonicación. Algunas de estas experiencias las hemos podido comprobar, particularmente el efecto del ultrasonido (E. Teruel-López y García-Tamayo J, resultados no publicados), que nos han proporcionado preparaciones tan puras en las que es factible observar los NC en forma semejante a la descrita por Vazquez al disociar las cápsidos de los reovirus⁽¹⁴⁸⁾.

Es innegable que con preparaciones mas puras, utilizando mica y carbón con una doble tinción de uranilo y molibdato de amonio, lograremos visualizar mucho mejor los nucleocápsidos y si se emplean detergentes el estudio de las subunidades capsoméricas aisladas va a ofrecernos un gran avance en el conocimiento de la estructura del virus de la EEV.

c) **Hemaglutininas.** Hemos aplicado algunas variantes en el método de tinción negativa como el uso del acetato de uranilo, molibdato de amonio y ácido fosfotúngstico a pH y concentraciones diferentes (García-Tamayo J, resultados no publicados) y estas experiencias señalan que la apariencia de las estructuras localizadas en las fracciones hemaglutinantes es variable de acuerdo a las condiciones en que se coloquen las partículas virales o sus componentes disociados y en particular de acuerdo con el pH del medio, con la temperatura y el tiempo de incubación.

He observado en las fracciones hemaglutinantes una partícula uniformemente redondeada con un diámetro de 10 nm y un centro de 4 nm. Algunas de estas estructuras circulares muestran proyecciones en forma de filamentos en su periferia y de 12 a 15 nm de largo y su ubicación generalmente en número de cinco, en el perímetro de su circunferencia son también bastante uniformes. Conviene llamar la atención sobre el hecho de que las hemaglutininas detectadas con el ME por diversos procedimientos de aislamiento y purificación han sido descritas como estructuras de forma variable; se han comparado por su forma con mallas fibrilares⁽⁹⁾, con rosetas⁽¹²⁰⁾ y con las partículas elementales de las mitocondrias⁽⁸¹⁾. La organización macromolecular de las estructuras anulares rodeadas por finos filamentos descritas en la fracción hemaglutinante de los gradientes de sacarosa con virus de EEV purificado y tratado con DOC, es similar a la que hemos observado en el líquido extraído de las placas de hema-

glutinación de Sever y a las que hemos hallado después de tratar el virus purificado con ultrasonido (E. Teruel-López, García-Tamayo J, resultados no publicados).

La estructura fina de las hemaglutininas demostrada previamente en nuestros estudios con el microscopio electrónico⁽⁵³⁾, coincide con la apariencia de las hemaglutininas del virus SF, aisladas por Von Bonsdorff⁽¹⁵²⁾. Por otra parte debe llamar la atención sobre la similitud entre las estructuras anulares antes señaladas descritas en este trabajo y la estructura descrita para la IgM⁽¹²⁰⁾ y para las moléculas de tiroglobulina antes de ser sometidas a la fijación⁽¹⁴⁾. Estudios con tinción negativa del virus Banzi⁽²⁴⁾ describieron estas estructuras como anillos con frecuencia hexagonales que corresponderían a capsómeros aislados. En la sección anterior (nucleocápsido) señalaba las características de los capsómeros aislados del virus de la EEV tratado con DDC; esta estructura anular descrita en la porción hemaglutinante no parece corresponder a las subunidades capsoméricas. Por otra parte no puede subestimarse el hecho de que en el tope del gradiente tratado con DOC coinciden las hemaglutininas con un incremento apreciable de las proteínas y las cuales las consideramos contaminantes correspondientes al tejido nervioso de los ratones. Sin embargo, el estudio cuidadoso de estas fracciones con el ME nos ha demostrado la presencia de nucleocápsidos que sin duda no se fueron al fondo del gradiente con la mayoría de ellos.

Los gráficos que muestran estos gradientes pueden observarse en nuestro trabajo reportado en 1974⁽⁵³⁾. En 1973, Narayan y cols. reportaron estructuras similares a los anillos mencionados, en células malignas cultivadas⁽¹¹²⁾, y el estudio exhaustivo de sus propiedades físico-químicas demostró que los anillos son de naturaleza proteica y que se asocian a los polirribosomas. El soporte de subunidades circulares similares, en virus RNA^(18, 24, 132) parece señalar que deben hacerse estudios mas cuidadosos sobre este tipo de estructura la cual considero diferente a las partículas hemaglutinantes descritas por Von Bonsdorff en el virus SF⁽¹⁵²⁾ y a las demostradas por nosotros con el virus de la EEV⁽⁵³⁾. La presencia constante a nivel macromolecular de una estructura, que si la consideramos como asociada a las espículas virales debe estar relacionada con importantes fenómenos inmunológicos y el papel que estas espículas del virus juegan en los mecanismos de fusión entre los virus y las células, o entre ellas y los anticuerpos del suero, merece ser mejor estudiado.

En reportes recientes sobre estudios bioquímicos con el virus Sindbis se ha señalado que por su composición físico-química las hemaglutininas son glicoproteínas con las propiedades infectantes⁽¹³⁴⁾. Observaciones reportadas por Soto Escalona en el VI Congreso Latinoamericano de

Microbiología celebrado en Caracas 1974, describieron una lipoproteína inhibidora del fenómeno de hemaglutinación, presente en el líquido alantóideo, que separaba la actividad hemaglutinante de la capacidad infectante del virus de la EEV. Es probable que el virus de la EEV tenga en su superficie receptores diferentes para la hemaglutinación y para asociar los complejos de anticuerpos relacionados con la infectividad. Ya he comentado algunos aspectos más concretos sobre la estructura físico-química de las glicoproteínas que poseen los togavirus en su superficie y la relación de éstas y la morfología de las partículas virales. El aislamiento de grandes cantidades de hemaglutininas permitirá su caracterización por electroforesis en geles de poliacrilamida o por inmunodifusión; igualmente experimentos de provocación de anticuerpos antihemaglutininas sin duda ayudarán a dilucidar la naturaleza inmunoquímica de estas estructuras macromoleculares. La visualización con el ME de las hemaglutininas en las fracciones hemaglutinantes constituye una guía importante hacia una más fácil identificación de las mismas.

Observaciones sobre el fenómeno encefálico comparando las alteraciones histológicas del bazo y del cerebro durante la fase aguda de la infección aguda con el virus de la encefalitis equina venezolana en ratas.

El virus de la EEV es letal para la mayoría de los roedores y demás animales de laboratorio (60, 90, 149) y su acción patógena se caracteriza por la producción de lesiones necrotizantes en el sistema nervioso y los órganos linfohematopoyéticos (61, 82, 90, 109, 149). Las lesiones que el virus de la EEV provoca en el sistema nervioso se han considerado secundarias al efecto directo del virus sobre las células nerviosas así como también los mecanismos de defensa dependientes del sistema inmunocompetente (15, 98, 124). El estudio histológico del cerebro y el bazo en ratas inoculadas ip con 200 ufp del virus de la EEV cepa Guajira, durante la fase aguda de la infección, ofrece un modelo experimental para examinar morfológicamente la importancia de la respuesta celular del huésped en la producción del fenómeno encefálico.

La patogenia de la infección con el virus de la EEV en ratas adultas ha sido examinada en detalle recientemente (85) y confirma nuestra impresión de que éste es un modelo experimental muy útil. Lo utilizaremos por el curso de esta discusión para examinar aspectos morfológicos y virológicos de la infección con este virus.

Los primeros cambios histológicos en el sistema nervioso central (SNC) se observan entre el 3er y 4to. día después de la inoculación. Las leptomeninges y el espacio de Virchow-Robin son infiltrados por células mononucleares y leucocitos polimorfonucleares (PMN) y estas células comienzan

a penetrar hacia el tejido nervioso. Estos hallazgos se relacionan con el aumento del título de anticuerpos y la multiplicación del virus en estos tejidos. El incremento progresivo de los anticuerpos es semejante al descrito previamente en ratones inoculados con el virus de la EEV (15). Estas modificaciones a nivel del suero pueden ser comparadas con los cambios histológicos de los folículos linfoides en el bazo y paralelamente observar la respuesta inflamatoria en el SNC. Se ha descrito previamente que esta respuesta está dada por dos sistemas, linfoide y macrofágico, que deben intervenir en la defensa del huésped ante la infección del virus de la EEV (124). La hiperplasia de las células mononucleares en la parte central del folículo linfoide, la actividad fagocítica en el centro germinal y el incremento exagerado de plasmocitos sobre todo después del 6to. día y los cuales se hacen muy evidentes en los cortes de una micra del material incluido en Araldita para ser examinado con el ME, pueden considerarse como la expresión celular del aumento de los anticuerpos. Se ha demostrado que la administración de suero inmune durante la viremia agrava la respuesta celular inflamatoria provocada por el virus de la EEV (15). Sin embargo se sabe que los anticuerpos no juegan un papel muy importante en la respuesta celular inflamatoria durante el fenómeno encefalítico (102). Aún cuando sabemos que se produce un incremento de los anticuerpos en las etapas iniciales de la infección, el fenómeno encefalítico va a depender fundamentalmente de la replicación del virus en el SNC y de la respuesta de las células inmunocompetentes del huésped.

Se ha demostrado antígenos de superficie para el virus Sindbis en la membrana de fibroblastos de embrión de ratón cultivados o infectados con ese virus, antes de producirse el efecto citopático mediado por linfocitos inmunes (103). Investigaciones similares *in vitro* también han sido realizadas con el virus de la EEV (124), y se ha señalado la importancia de las células T en la patogenia de la infección con este virus. La inmunidad mediada por células también ha sido considerada recientemente como un factor decisivo en los fenómenos de protección cruzada que se observan en las infecciones con togavirus (122). Estos trabajos de investigación coinciden en considerar a los linfocitos esplénicos (T) y no a las células linfoides derivadas de la médula ósea (B), como las responsables de la citólisis por mecanismos inmunológicos durante la infección con togavirus y específicamente en el caso de la infección con el virus de la EEV.

En el modelo experimental que nos ofrecen las ratas inoculadas por vía *ip* con una dosis letal de una cepa muy virulenta (Guajira) del virus de la EEV, podemos prestarle especial atención a los cambios celulares a nivel del bazo y del cerebro. En este trabajo estoy reportando únicamente los hallazgos histológicos, pero debo aclarar que el estudio ultraestructural y con inmunofluorescencia, tanto para antígenos virales como para la iden-

tificación de los linfocitos T y B en ratas, también se está llevando a cabo y sus resultados serán publicados oportunamente.

Se ha propuesto que los linfocitos comunes (T) reaccionan con los antígenos inducidos por los virus en la superficie de las células infectadas para provocar la citólisis. Por otra parte las células T van a activar a los macrófagos para que fagociten las partículas virales y las células infectadas (124). A pesar de que el efecto de las células mononucleares en el fenómeno encefalítico ha sido bien estudiado *in vitro* (63), no existen estudios *in vivo* que hayan examinado el papel de las células inmunocompetentes desde el punto de vista morfológico, ni se ha relacionado la respuesta celular en el SNC y en el bazo con la titulación del virus en los tejidos y la determinación de los anticuerpos en el plasma, durante las encefalitis provocadas por los togavirus.

Uno de los datos importantes en la infección con el virus de la EEV en ratas, cuando se utiliza la vía *ip*, es la provocación de una viremia transitoria que se observa durante el segundo día después de la inoculación. Si se examina cuidadosamente el bazo entre el 3er. y 4to. día pos inoculación, es posible ver un incremento de los pequeños linfocitos a lo largo de las trabéculas y alrededor de las arteriolas, esta proliferación celular es paralela a la actividad macrofágica que se inicia en los centros germinales de los folículos linfáticos. Si comparamos estos cambios con la respuesta inflamatoria en el SNC, veremos como las células que aparecen alrededor de los vasos y en las meninges son mononucleares y macrófagos.

La respuesta inicial de las células inflamatorias ante la infección con el virus de la EEV es mediada desde el punto de vista histológico por macrófagos y linfocitos T. Esta aseveración se puede hacer sobre bases puramente histológicas ya que la ubicación de las dos poblaciones linfocíticas en el bazo es un hecho bien conocido. Por otra parte ha sido bien estudiado el origen de las células inflamatorias que se ven en el SNC durante las encefalitis virales (100, 101). Inicialmente se demostró por medio de autorradiografía que las células inflamatorias que infiltraban el SNC durante la infección con el virus Sindbis eran predominantemente mononucleares (87). Posteriormente estudios autorradiográficos demostraron el origen hematógeno de las células inflamatorias durante la producción experimental de encefalitis japonesa B (46). También se demostró que las células inflamatorias que intervenían en los fenómenos encefalíticos provocados por el virus Sindbis eran inmunológicamente específicas (102). Las observaciones histopatológicas reportadas en este trabajo confirman que las células que intervienen en los fenómenos inflamatorios en el SNC durante la fase aguda de la infección con el virus de la EEV son linfocitos y macrófagos.

El efecto destructivo de los linfocitos sobre las células infectadas por virus se ha estudiado desde hace años (158). Se ha demostrado con el ME como los linfocitos son capaces de adherirse y penetrar en neuronas que contienen antígenos (7a). Se ha descrito también la transformación de linfocitos inducida por el virus de la EEV (98) y se piensa que el efecto citotóxico de los linfocitos se cumple por un fenómeno de atracción hacia los sitios donde existen antígenos virales, bien sea antígeno o agrupaciones de complejos antígeno-anticuerpo y complemento en la membrana plasmática de las células. Los virus van a comportarse como antígenos y la activación de los linfocitos y macrófagos va a provocar la liberación de una serie de mediadores químicos solubles que van a producir efectos tóxicos sobre las células inhibiendo la multiplicación viral o produciendo citólisis.

La respuesta celular ha sido considerada como el factor principal en la disminución del contenido de partículas virales en el tejido durante la infección con el virus Sindbis (64). Son las células y no los anticuerpos los que intervienen en la destrucción viral en el SNC, y esto también se ha demostrado inmunosuprimiendo la respuesta celular con cytoxan en ratones infectados con el virus Sindbis de modo que se bloquean los mecanismos que influyen en la reducción del contenido de partículas virales en el SNC hasta que se restituye la respuesta inmune (100). También se ha demostrado que los linfocitos T constituyen la mayor parte de las células que responden durante la encefalitis provocada por el virus Sindbis (63).

Los resultados de esta investigación señalan que la reacción inflamatoria que se observa en el SNC durante los primeros cuatro días después de la inoculación ip con el virus de la EEV, está representada por células mononucleares pequeñas, macrófagos y algunos leucocitos PMN. En esta etapa se ve un aumento de linfocitos en el bazo en las áreas correspondientes a las células T. En el curso de la infección y durante los días 6to a 8avo post inoculación, la destrucción tisular en el SNC aumenta y el infiltrado penetra en el neuropilo con intensa actividad macrofágica. Ya en esta fase la reacción glial y la necrosis es evidente. Estas observaciones señalan que el fenómeno encefalítico está provocado por la destrucción tisular que causan células de estirpe linfoide del tipo linfocitos T y macrófagos que deben ser activados inmunológicamente para reconocer y fagocitar los antígenos virales. El fenómeno descrito es similar al que se ha observado en otras infecciones con togavirus (25), y señala que paradójicamente, la respuesta inmune protege y daña al huésped.

Estudio histológico y ultraestructural de las secuelas provocadas por el virus de la encefalitis equina venezolana en el sistema nervioso de ratas.

La acción patógena del virus de la EEV sobre los animales de labora-

torio y en particular sobre los roedores ha sido comentada previamente en este trabajo. Para lograr un modelo experimental similar al humano, inoculamos ratas adultas Sprague-Dawley por vía ip con una dosis letal del virus de la EEV, cepa Guajira, y extremando los cuidados en la forma que se indicó en la sección de material y métodos, logramos la supervivencia de algunos animales. La idea de utilizar las ratas adultas como el animal de escogencia para este experimento, se originó del conocimiento de que era posible provocar infecciones subletales en roedores salvajes cuando el virus de la EEV se administra en dosis moderadas⁽¹⁶⁰⁾. Este modelo experimental se ha utilizado para estudiar el desarrollo del virus en roedores salvajes, considerados como reservorios del virus de la EEV⁽¹⁶⁰⁾; sin embargo, este tipo de investigación carecía de correlación morfológica, y en realidad no existían trabajos que describieran lesiones del SNC como secuela de la infección con el virus de la EEV hasta nuestra reciente publicación del año 1979⁽⁵⁵⁾ la cual resume los resultados de estos experimentos.

La importancia de estudiar las secuelas de la infección con el virus de la EEV es mayor, dada la alta morbilidad que se observa durante las epidemias de encefalitis equina venezolana. Por otra parte, se han descrito alteraciones de las funciones cerebrales e incremento en la aparición de epilepsia en niños que sufrieron de encefalitis equina venezolana⁽⁹⁵⁾. Estos hallazgos nos llevaron a plantear la necesidad de estudiar experimentalmente las secuelas de la infección con el virus de la EEV.

Los cambios patológicos que el virus de la EEV induce en el SNC se producen a consecuencia de la multiplicación del virus en el tejido nervioso y del efecto que la reacción inmunológica del huésped provoca. Ya en la parte anterior se discutió el papel de la respuesta inmune en la fase aguda de la infección provocada en ratas por el virus de la EEV. El hallazgo entre 1 y 3 meses después de la inoculación de áreas de reblandecimiento, sobretudo en la substancia gris cortical y la actividad de células macrófágicas, se corresponde con las lesiones descritas en la fase aguda de la infección. Llama la atención la recuperación clínica de los animales, los cuales a los 20 días no presentaban manifestaciones de enfermedad, contrastando este hecho con la severa crisis durante los 8 a 15 días después de la inoculación ip que incluía en casi todos los casos la parálisis del tren posterior.

El estudio del SNC en las ratas sobrevivientes demostró la presencia de células aparentemente de origen hematógeno que infiltraban las áreas lesionadas, en su mayoría monocitos y algunos plasmocitos y linfocitos. La ubicación de estas células era en el neuropilo, en los espacios perivasculares y cerca de los focos de reblandecimiento, y su distribución y apariencia

males infectados en forma latente o crónica con otros arbovirus (161, 162). Estas investigaciones vienen a ser de gran interés si se examinan los resultados reportados recientemente por Carreño y Esparza (26), demostrando que las células de mosquito pueden infectarse en forma latente con el virus de la EEV pudiendo inducirse la aparición posterior de la información viral reprimida.

No hay duda de que las lesiones descritas en el SNC de las ratas, varios meses después de la inoculación con el virus de la EEV, pueden ser consideradas como secuelas de la infección con este virus. La ausencia de reportes previos sobre este tipo de investigación hace que los resultados sean extrapolables al modelo de infección en el humano y explicarían los fenómenos descritos clínicamente como resultado de las epidemias de encefalitis equina venezolana (27, 95). Es interesante señalar que la actividad de las células mononucleares persistía después de tres meses en ausencia de partículas virales, hecho éste que señala nuevamente la importancia de los fenómenos inmunológicos en la producción de las lesiones encefalíticas y que abre el camino para investigaciones más completas sobre la posibilidad de infecciones virales lentas con el virus de la encefalitis equina venezolana.

Efecto del virus de la EEV sobre la toxoplasmosis cerebral en ratas.

Las ratas son animales que pueden ser afectados en forma natural por el *Toxoplasma gondii*. Como el hombre y otros mamíferos (ratones, cobayos, cerdos, perros, visones y en ocasiones gatos), las ratas pueden infectarse durante el período fetal con este parásito (89).

La infección aguda con el *Toxoplasma gondii* es seguida por una respuesta inmunológica mediada por células, la cual puede evolucionar a una fase latente caracterizada por el enquistamiento de los toxoplasmas en el cerebro y en otros órganos (59, 89, 99); se ha postulado que la reactivación de las lesiones cerebrales es consecuencia de la ruptura de los quistes con salida de los parásitos provocando un cuadro de encefalitis (41). Cada vez es mayor el número de reportes que asocian esta reactivación de la toxoplasmosis con deficiencias del sistema inmune o enfermedades malignas (29, 70, 96, 150). Experimentalmente se sabe que la inmunosupresión o la medicación esteroidea reactiva las lesiones encefalíticas causadas por el toxoplasma (42). También se sabe que la protección inmune que dan los anticuerpos circulantes es poco importante en la toxoplasmosis (80). Todos estos factores nos conducen a pensar que el mecanismo por el cual se produce la activación de las lesiones cerebrales durante la infección natural con toxoplasma en el SNC de las ratas al ser éstas inoculadas con el virus de la EEV, tiene como base una alteración de los mecanismos inmunológicos que mantienen latente la infección y que se modifican por acción del virus de la EEV.

es similar a la que se ha descrito para el infiltrado inflamatorio que se observa en las encefalitis virales⁽¹⁰²⁾. El origen de estas células inflamatorias que aparecen durante las encefalitis virales ha sido estudiado exhaustivamente^(46, 100, 101). Se sabe que tanto las células mononucleares de origen hemático como los pericitos son susceptibles de transformarse en macrófagos cerebrales y a estas células se les ha denominado microglia, células "M" o macrófagos^(30, 100). Los hallazgos ultraestructurales confirman la naturaleza del neuropilo, cuyos largos pseudópodos parecen rodear como dedos las neuronas y cuya actividad macrofágica es mas evidente en las áreas de reblandecimiento. En la parte anterior de este trabajo ya se discutió el papel de los macrófagos como parte de la respuesta inmune y su relación con los linfocitos inmunológicamente activados, para actuar sobre los antígenos virales específicos a nivel de la membrana de las células nerviosas. Mayores detalles sobre esta relación son ofrecidos por Rabino-witz y Proctor en su trabajo del año 1974⁽¹²⁴⁾ y en nuestra publicación reciente sobre el efecto de la respuesta celular en el fenómeno encefalítico inducido por el virus de la EEV⁽⁵⁴⁾.

Los cambios degenerativos en los axones que se vieron con el ME en las ratas sobrevivientes, parecen secundarios a degeneración transináptica de las neuronas. Alteraciones similares han sido descritas por Cox en ratas⁽³⁰⁾ y el papel de las enzimas lisosómicas en estos fenómenos también fué discutido por ese autor. En este trabajo he señalado la importancia de la actividad de las enzimas lisosómicas y en particular de la fosfatasa ácida en la producción de las alteraciones del SNC inducidas por el virus de la EEV; estos hallazgos también fueron señalados previamente en mis publicaciones del año 1971^(47, 48), y he discutido también el efecto de la infección con el virus rábico sobre los lisosomas neuronales en bovinos⁽⁵²⁾. Es lógico suponer que las enzimas lisosómicas juegan un papel importante en la producción de las lesiones necrotizantes en el SNC y también en la persistencia de la reacción inflamatoria durante los meses siguientes a la inoculación intraperitoneal, pero se requieren mas estudios citoquímicos para demostrar estos hechos.

Lo que no es posible precisar con certeza, es hasta que punto toda esta reacción celular es debida al efecto del virus sobre el tejido nervioso o a la respuesta celular inmune contra los antígenos virales presentes en las membranas de las células nerviosas. La ausencia de partículas virales y los comentarios hechos en la parte anterior de este trabajo, refuerzan la segunda hipótesis.

Se ha sugerido que el virus de la EEV puede persistir en forma latente en las ratas que son infectadas experimentalmente con este virus⁽¹⁶⁰⁾, y se han descrito enfermedades subagudas degenerativas del cerebro en ani-

En este trabajo hemos descrito evidencias morfológicas y virológicas que señalan el papel de la respuesta celular inmune durante la infección aguda con el virus de la EEV en ratas Sprague-Dawley. También se han reportado lesiones del sistema linforeticular y mieloide en hamsters inoculados con el virus de la EEV (154) y es un hecho conocido que ciertas especies animales como el cobayo y los conejos sufren graves lesiones del sistema linfohematopoyético durante la infección con el virus de la EEV (149, 154). Hemos descrito previamente en este trabajo evidencias morfológicas sobre la importancia de los linfocitos T en la respuesta temprana del sistema inmune de las ratas infectadas con el virus de la EEV y nuestros hallazgos están de acuerdo con reportes previos que describen la activación de linfocitos T *in vitro* inducida por el virus de la EEV (78, 98).

Al examinar las alteraciones del SNC en las ratas utilizadas como control se evidenciaron las lesiones latentes de toxoplasmosis descritas en diversas especies animales (41, 42, 80). Las características histológicas de estas lesiones son diferentes del complejo glio-mesenquimático y alteraciones focales o difusas provocadas por el virus de la EEV en el SNC de ratas (54). Desde el 4to. día post inoculación, la actividad de los focos necróticos con presencia de células balonadas y áreas de inflamación con nidos de parásitos que parecen originarse por ruptura de quistes fué evidente. Las áreas de necrosis eosinofílica coronadas por células espumosas y la identificación de los parásitos en estas lesiones son similares a las descritas durante la reactivación de la toxoplasmosis experimental por esteroides y citostáticos (42). Estas áreas focales con parásitos fagocitados dentro de células microgliales hinchadas con aspecto de pseudoquistes se han reportado como características de la infección activa con *Toxoplasma gondii* (92). Estos hallazgos coinciden con estudios experimentales que demuestran la capacidad del toxoplasma para multiplicarse intracelularmente y para intervenir directamente en la formación de los quistes (99). En ausencia de quistes el diagnóstico de toxoplasmosis se puede hacer por la identificación de los parásitos en las células fagocíticas presentes en las áreas de necrosis o en las vacuolas que confluyen formando los pseudoquistes (42). La posibilidad de confundir los parásitos con material extracelular o restos de material nuclear ha sido señalada previamente (41). Sin embargo, las lesiones del SNC causadas por el toxoplasma en las ratas descritas en este trabajo son bastante típicas y los parásitos fueron demostrados fácilmente. Nuestro material fué enviado para consulta al Instituto de Investigaciones Veterinarias confirmándose la presencia de los toxoplasmas en el SNC.

Este modelo de infección natural con *Toxoplasma gondii* podía servir para examinar experimentalmente la toxoplasmosis y la EEV en la rata y evaluar la alteración de la respuesta inmune con mecanismo que provoca

la reactivación de la toxoplasmosis inducida por la infección con el virus de la EEV. Experimentos de esta naturaleza para evaluar la respuesta inmune han sido descritos en la toxoplasmosis con hamsters recibiendo esteroides y citostáticos⁽⁴¹⁾; sin embargo aún quedan muchas interrogantes sobre la patogenia de la encefalitis por toxoplasma, su relación con la inmunidad celular, el mecanismo de ruptura de los quistes, la predilección del toxoplasma por albergarse en el SNC, etc. El modelo experimental que proveen las ratas como animal capaz de sobrevivir a la infección con el virus de la EEV y en el cual se pueden hallar lesiones residuales producidas por la infección viral aguda, ha sido señalado antes por este trabajo. La posibilidad de combinar experimentalmente estas dos situaciones para una mejor evaluación de los mecanismos de inmunidad celular implicados en la patogenia de ambas infecciones, toxoplasmosis y encefalitis equina venezolana debe estimular el interés para ampliar la investigación en este campo.

Patogenia de la infección intrauterina con el virus de la EEV.

La capacidad teratogénica del virus de la EEV, merece ser examinada con especial atención, ya que clínicamente la encefalitis equina venezolana, puede manifestarse como una enfermedad febril con cefalea y malestar general que dura varios días^(27, 114); esta forma es mas frecuente que la denominada "forma localizada" con signos neurológicos y fue descrita en la mayoría de los casos durante la epidemia de encefalitis equina venezolana en la Guajira venezolana el año 1962^(11, 27, 114). Wenger ha mencionado como se observaron con frecuencia abortos durante el primer tercio del embarazo, en mujeres que habitaban al norte del Estado Zulia, Venezuela durante la epidemia del año 1962⁽¹⁵⁷⁾. En nuestro modelo experimental la imposibilidad de observar malformaciones inducidas en las ratas por la cepa Guajira del virus de la EEV, se debió fundamentalmente a la muerte de los embriones con reabsorción, durante el primer tercio de la preñez. La virulencia de la infección, induce en las ratas durante la primera semana y generalmente también en la segunda semana de gestación, graves lesiones fetales. Esta observación es posiblemente similar a la que de acuerdo con los escasos datos clínicos se ha descrito en las mujeres embarazadas durante la epidemia de encefalitis equina venezolana⁽¹⁵⁷⁾.

Wenger ha reportado hallazgos de necrosis cerebral masiva en fetos nacidos de madres que habían padecido la infección con el virus de la encefalitis equina venezolana durante el tercer trimestre del embarazo^(156, 157). Estos hallazgos no han sido hasta el presente reproducidos experimentalmente. Nuestros resultados indican que el virus de la EEV atraviesa la placenta para infectar al feto y este fenómeno ocurre primariamente durante la fase de viremia. La placenta demostró ser un sitio donde el virus se mul-

tiplica activamente. La replicación del virus a nivel de las células trofoblásticas y en el endotelio vascular es una fuente ininterrumpida de agentes infecciosos que llegan al feto. Este mecanismo de infección es similar al descrito para el virus de la rubeola (5, 38, 118).

El examen histológico de la placenta de las ratas Sprague-Dawley, mostró moco desde el segundo día post inoculación, se observaron cambios de necrosis focal y trombosis en los vasos deciduales. Posteriormente entre el segundo y cuarto día post inoculación las alteraciones estaban caracterizadas por necrosis focal de las vellosidades coriales, trombosis de capilares y arteriolas e infartos placentarios de tamaño variable. Estas alteraciones son similares a las descritas en la infección con el virus de la rubeola (38, 104, 147). La patogenia de las lesiones fetales en la infección congénita con el virus de la rubeola se considera debida a embolización del endotelio vascular necrótico de la placenta (5, 38, 118, 147); estos cambios persisten en los niños que presentan síndrome de rubeola congénita en quienes se han descrito alteraciones en el endotelio de los vasos cerebrales (128). La similitud entre las lesiones histológicas y los títulos del virus en placenta y feto durante la infección con estos dos Togavirus, Rubeola y EEV parece ser evidente. Al aumentar la infectividad del virus de 200 a 2000 ufp las alteraciones descritas se produjeron con mayor intensidad y mas rápidamente en las ratas siendo mas severas las alteraciones placentarias y fetales.

Es necesario examinar con mas detalle el mecanismo de producción de los cambios histológicos descritos a nivel de la placenta. Estudios con el microscopio electrónico de transmisión y de barrido a nivel del endotelio de los vasos deciduales están siendo realizados en nuestro laboratorio y los resultados de esta investigación serán reportados oportunamente, sin embargo histológicamente es evidente que los infartos placentarios están relacionados con el daño vascular que se observa desde las etapas mas tempranas de la infección; el compromiso de la oxigenación fetal asociado a estos infartos va a contribuir a la aparición de lesiones irreparables en el feto. Se han descrito lesiones arteriolas en los vasos mesometriales durante el embarazo de acures sometidos a hipoxia crónica y estos cambios se han relacionado con la endotelialización de los canales vasculares maternos, la cual es en parte producida por las células sincitiales (34). Las células trofoblásticas invasoras, contribuyen a tapizar los canales vasculares y son ellas las que mas fácilmente son alteradas por la hipoxia (34) y probablemente también por el virus de la EEV. La replicación del virus de la EEV en estas células, parece provocar fenómenos de necrosis los cuales posiblemente se producen a través de enzimas hidrolíticas como hemos descrito previamente en el cerebro de ratones recién nacidos (48). Igualmente la invasión del endotelio por leucocitos polimorfonucleares

y demás cambios asociados al fenómeno inflamatorio, provocará la lisis celular con salida de gran cantidad de partículas virales hacia la sangre. Finalmente la inmadurez de la barrera hematoencefálica del feto constituye un factor coadyuvante en la vulnerabilidad del sistema nervioso a la penetración del virus.

A pesar de la imposibilidad de producir malformaciones congénitas en ratones con el virus de la encefalitis equina venezolana (143) estudios con el virus de la encefalitis Japonesa B (22), han demostrado la infección intrauterina de cerdos y con el virus de la encefalitis de San Luis (3) han demostrado como este atraviesa la placenta (2) y es capaz de provocar daño cerebral mínimo con déficit neurológico en ratones cuyas madres se infectaron durante el octavo día de gestación. No estamos en capacidad de extrapolar estos resultados ni los nuestros al problema de la infección con el virus de la EEV en humanos. La transmisión transplacentaria de otros togavirus similares a EEV se había descrito en humanos desde 1953 (137). Sin embargo es preocupante el hecho de que se hayan descubierto niños con síntomas autistas y una alta incidencia de trastornos de conducta en hijos de madres que sufrieron la infección con el virus de la rubeola durante el embarazo (28, 35). No se ha planteado el que ocurran manifestaciones similares en madres que hayan padecido de encefalitis equina venezolana; no hay duda de que los resultados que presentamos en este trabajo y evidencias previamente descritas (156, 157) sugieren que debe estudiarse esta posibilidad en nuestro medio. El interés que se ha despertado en los últimos años por el estudio de los trastornos de conducta y el retraso mental en nuestra población infantil, contrasta con la escasez de datos epidemiológicos enfocados hacia aspectos de etiopatogenia.

A los resultados discutidos en este trabajo debemos añadir un comentario sobre la importancia de estudios clínicos realizados en Colombia (95) en los cuales se demostraron modificaciones electroencefalográficas en niños, cuatro años después de la infección con el virus de la EEV. Estas observaciones se suman a los resultados experimentales ya discutidos en esta revisión y reportados recientemente por nosotros sobre las alteraciones del sistema nervioso central en ratas sobrevivientes a la infección con el virus de la EEV (55). Todos estos factores señalan la necesidad de estudiar de manera mas integral nuestra población en las áreas donde la EEV es endémica. Esa investigación debe comprender aspectos sociales, clínicos, virológicos y patológicos y no puede desligarse de una evaluación epidemiológica muy estricta del problema. Cuando este cometido se lleve a cabo sentiremos que nuestros esfuerzos dedicados al trabajo experimental con el virus de la EEV no han sido en vano.

Agradecimientos

Al Dr. Pedro Iturbe, quien durante muchos años fué el motor que impulsó todos los trabajos producidos por el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Hospital General del Sur, en Maracaibo. Al Dr. Américo Negrette, pionero de la investigación científica en el Zulia, y al grupo de investigadores del Instituto de Investigaciones Clínicas de la Universidad del Zulia, especialmente a los Dres. Slavia y Elena Ryder, Ernesto Bonilla y Lic. María Teruel de López, quienes en algún momento o por muchas horas trabajaron a mi lado. A los Dres. Luis Carbonell y Gernot Bergold, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), en Caracas, quienes me brindaron las facilidades necesarias para mis investigaciones. Especial mención para el Dr. José Esparza, con quien continué trabajando, y al Dr. Gabriel Carreño quien, cuando era estudiante graduado, dedicó muchas horas de su tiempo para cuidar los animales infectados. Al Instituto Anatomopatológico de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, en donde he venido trabajando los últimos tres años, el cual me ha permitido continuar haciendo investigación y donde se me han dado grandes facilidades para llevar a cabo estos trabajos. La valiosa colaboración de la Srta. Emilia Pérez, quien dirige el Bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la Universidad Central de Venezuela, ha sido fundamental, sobretudo en la última parte de este trabajo, en la cual la determinación precisa de la edad gestacional de las ratas ha sido pacientemente determinada por ella. Sin esta valiosa ayuda no podríamos ofrecer estos resultados, ni continuar examinando el efecto teratogénico del virus de la EEV. Al personal técnico de microscopía electrónica, de fotografía, y al personal de secretaría de estas instituciones que colaboraron grandemente en la realización de este trabajo.

El proyecto de investigación fué financiado parcialmente por el CONICIT, subvención N° S1-907.

ABSTRACT

Experimental Venezuelan Equine Encephalitis: histologic, histochemical and ultrastructural study. *García-Tamayo J. (Sección de Microscopía Electrónica, Instituto Anatomopatológico, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela). Invest Clín 21(4): 277-371, 1980.*— Ultrastructural observations on the development of Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus in suckling mice show the process of formation of nucleocapsides and virus particles by budding at the plasma membrane or at the smooth membranes of the tortuous Golgi cisternae. Purified VEE virus is examined with negative staining technique, the envelope, nucleocapside and hemagglutinins are separated by DOC and virus particles examined in the presence of antigen sera by the electron microscope. Morphogenesis of VEE virus is also examined at the heart, lungs, nervous system and reticuloendothelial system; the role of the endothelium in the transport of virus particles is also examined. Acid phosphatase activity in the nervous tissue is discussed regarding the importance of the lysosomes and virus infection. Some histochemical findings concerning the APTase activity in the nervous tissue and virus particles are also discussed. Light microscopic study of the spleen and the nervous tissue during the acute infection of the rat by VEE virus is examined and changes in the tissues are related to the cellular mechanism

of the immune response. The nervous tissue of rats surviving the acute infection with VEE virus is examined with the light and the electron microscope and the alterations are considered to be sequelae of the infection. The findings are compared with neurological sequelae described in humans. The nervous tissue of rats inoculated with VEE virus and some non inoculated animals used as control revealed histologic evidences of toxoplasmosis. The effect of VEE virus by reactivating the latent lesions observed in cerebral toxoplasmosis is examined and the mechanisms involved in the immune response are discussed. Alterations of the placentas and fetuses of rats inoculated ip with VEE virus are investigated by virology and light microscopy. The virus replicate in the placenta. During the first and second week of pregnancy there is always fetal death. Alterations on the 3rd week are located in the mesometrial and decidual vessels as early as the 2nd day post inoculation. Lesions of placenta, and fetus are severe and they are compared with the pathogenic mechanisms involved in the intrauterine effect of rubella virus.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1—ACHESON N, TAMM I: Replication of Semliki Forest virus: an electron microscopic study. *Virology* 32: 128-143, 1967.
- 2—ANDERSEN AA, HANSON RP: Experimental trasplacental transmission of St. Louis encephalitis virus in mice. *Infect Immunity* 2: 320-325, 1970.
- 3—ANDERSEN AA, HANSON RP: Intrauterine infection of mice with St. Louis encephalitis virus: Immunological, physiological, neurological and behavioral effects on progeny. *Infect Immunity* 12: 1173-1183, 1975.
- 4—ALEVIZATOS AC, MACKINNEY RW, FEINGIN RD: Live attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccine. *Amer J Trop Med Hyg* 16: 762-768, 1967.
- 5—ALFORD CA, NEVA FA, WELLER TH: Virologic and serologic studies of human products of conception after maternal rubella. *N Engl J Med* 271: 1275-1281, 1964.
- 6—ALLISON AC, MALLUCI L: Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus infected cell cultures. *J Exp Med* 121: 463-477, 1965.
- 7—ALMEIDA J, CINADER B, HOWATSON A: The structure of antigen-antibody complexes. *J Exp Med* 118: 327-340, 1963.

- 8- ALMEIDA J, CINADER B, NAYLOR D: Univalent fragments of antibody A study by electron microscopy. *Immunochem* 2: 169-184, 1965.
- 9- ARSTILA P: Small sized hemagglutinin of vesicular stomatitis virus released spontaneously and with Nonident P 40. *Acta Pathol Microbiol Scand* 81: 27-36, 1973.
- 10- AUSTIN FJ, SCHERER WF: Studies of viral virulence. Growth and histopathology of virulent and attenuated strains of Venezuelan equine encephalitis virus in hamster. *Amer J Pathol* 62: 195-210, 1971.
- 11- AVILAN J: El brote de encefalitis equina venezolana al norte del Estado Zulia a fines de 1962. *Rev Ven SAS* 29: 231-321, 1974.
- 12- BACHI T, AGUET M, HONE C: Fusion of eritrocytes by Sendai studie by immunofreeze-etching. *J Virol* 11: 1004-1210, 1973.
- 13- BASTARDO JW, BERGOLD GH, MUNZ K: Structure of Oriboca, Restan and Manzanilla arbovirus. *Amer J Trop Med Hyg* 17: 115-119, 1968.
- 14- BERG G: An electron microscopic study of the thyroglobulin molecule. *J Ultrastruct Res* 42: 324-336, 1973.
- 15- BERGE TO, GLEISER CA, GOCHENOUR WE, MIESSE E, TIGERTT WD: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis. II. Modification by specific immune serum of response of central nervous system of mice. *J Immunol* 87: 509-517, 1961.
- 16- BERGOLD GH, WEIBEL J: Demonstration of yellow fever virus with the electron microscope. *Virology* 17: 554-562, 1962.
- 17- BERGOLD GH, MAZZALI R: Plaque formation by arboviruses. *J Gen Virol* 2: 273-284, 1968.
- 18- BOLOGNESI DP, BAUER H, GELDERBLOM M, HUPER G: Polipeptides of avian RNA tumor viruses. IV. Components of the viral envelope. *Virology* 47: 551-566, 1972.
- 19- BROWN DT, NAITE MRF, PFEFFERKORN ER: Morphogenesis of Sindbis virus as seen with freeze-etching techniques. *J Virol* 10: 524-536, 1972.
- 20- BROWN F, SMALE CJ, HORZINEK MC; Lipid and protein organization in Vesicular Stomatitis and Sindbis virus. *J Gen Virol* 22: 455-458, 1974.

- 21- BURKE DJ, KEEGSTR A K: Purification and composition of the protein from Sindbis virus grown in chick and BHK cells. *J Virol* 20: 676-86, 1976.
- 22- BURNS KF: Congenital Japanese B encephalitis infection in swine. *Pro Soc Exp Biol Med* 75: 621-625, 1950.
- 23- BYKOVSKY AF, YERSHOV FI, ZHDANOV VM: Morphogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Virol* 4: 496-504, 1969.
- 24- CALBERG-BACO CM, RENTIER-DELRUE F, OSTERRIETH PM, DUCHESNE PY: Electron microscopy studies on Banzi virus particles and its development in the suckling mice brains. *J Ultrastruct Res* 53: 193-203, 1975.
- 25- CAMENGA DK, NATHANSON N: An immunopathologic component in experimental togavirus encephalitis. *J Neuropath Neurol* 35: 492-500, 1976.
- 26- CARREÑO G, ESPARZA J: Induction of Venezuelan equine encephalitis (Mucambo) virus by Iododeoxyuridine in chronically infected "cured" cultured mosquito cells. *Intervirology* 8: 193-203, 1977.
- 27- CASTILLO CE: Informe sobre una reciente epidemia de encefalitis equina venezolana en la zona sur del Estado Zulia. *Rev Ven SAS* 29: 325-353, 1964.
- 28- CHESS S: Autism in children with congenital rubella. *J Autism Child Schizo* 1: 33-47, 1971.
- 29- COHEN SN: Toxoplasmosis in a patient receiving immunosuppressive therapy. *JAMA* 211: 657-660, 1970.
- 30- COX VS: Ultrastructure of the axon reaction in the immature rat thalamus. *J Neuropath Exp Neurol* 35: 191-203, 1976.
- 31- DALRYMPLE JM, SCHESLINGER S, RUSSELL PK: Antigenic characterization of the two Sindbis envelope glycoproteins separated by isoelectric focussing. *Virology* 69: 93-103, 1976.
- 32- DAVID A: Lipid composition of the Sindbis. *Virology* 46: 711-720, 1971.
- 33- DE DUVE C: From cytochromes to lysosomes. *Fed Proc* 23: 1045-1049, 1963.

- 34- DELAQUERRIERE-RICHARDSON L, VALDIVIA E: Effects of simulated high altitude on pregnancy. Arch Pathol 84: 405-417, 1967.
- 35- DESMOND MM, WILSON GS, WERNIAUD WM: The early development of infants with congenital rubella. Adv Teratol 4: 39-63, 1970.
- 36- DILL GS, PEDERSON CE, STOOKEY JL: A comparison of the tissue lesions produced in adult hamsters by two strains of avirulent Venezuelan equine encephalomyelitis virus. Amer J Pathol 72: 13-24, 1973.
- 37- DOMINGUEZ A: Estudio neuroanatomopatológico en la encefalitis equina venezolana. Comunicación preliminar. Invest Clín 4(6): 7-10, 1963.
- 38- DRISCOLL SG: Histopathology of gestational rubella. Amer J Dis Child 118: 49-53, 1969.
- 39- EHRENKRANZ NJ, SINCLAIR MC, BUFF C, LYMAN DO: The natural occurrence of Venezuelan equine encephalitis in the United States. First case and epidemiologic investigations. N Engl J Med 282: 298-302, 1970.
- 40- ERLANDSON RA, RABOCK VI, SOUTHAN CM, BALEY RB, SHIPKEY FM: Semliki Forest virus in HEP-2 cell cultures. J Virol 1: 996-1009, 1967.
- 41- FRENKEL JK: Toxoplasmosis pathology of the nervous system. In: Pathology of the nervous system. Minckler J., ed. Vol. 3, pp 2521-2538. McGraw-Hill Book Co., New York. 1972.
- 42- FRENKEL JK, NELSON BM, ARIAS-STELLA J: Inmunosuppression and Toxoplasmic encephalitis. Human Path 6: 97-111, 1975.
- 43- FRIEDMAN RM: Protein synthesis directed by arbovirus. J Virol 6: 26-32, 1968.
- 44- FRIEDMAN RM, GRIMLEY PM: Inhibition of arbovirus assembly by Cyclohexamide. J Virol 3: 292-299, 1969.
- 45- FRIEDMAN RM, LEVIN JG, GRIMLEY PM, BEREZESKY IK: Membrane associated replication complex in arbovirus infection. J Virol 10: 504-515, 1972.
- 46- FUJITA S, KITAMURA T: Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia. Acta Neuropath (Berlin) Suppl VI 292-296, 1975.

- 47- GARCIA-TAMAYO J: Desarrollo del virus de la encefalitis equina venezolana en el tejido nervioso de ratones recién nacidos: Ultraestructura e histoquímica. *Invest Clín* 12(37): 7-63, 1971.
- 48- GARCIA-TAMAYO J: Acid phosphatase activity in mouse brain infected with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Virol* 8: 232-241, 1971.
- 49- GARCIA-TAMAYO J, RYDER S, RYDER E: Morfología del virus de la EEV purificado a partir de cerebro de ratón lactante. *Rev Micros Electron* 1: 40-41, 1972.
- 50- GARCIA-TAMAYO J, AVILA-MAYOR A, ANZOLA-PEREZ E: Rabies virus neuronitis in humans. *Arch Pathol* 94: 11-15, 1972.
- 51- GARCIA-TAMAYO J: Venezuelan equine encephalomyelitis virus in the heart of newborn mice. *Arch Pathol* 96: 294-297, 1973.
- 52- GARCIA-TAMAYO J, MALDONADO-ALVAREZ C: The development of rabies virus in the central nervous system of humans and bovine. *Excerpta Med Int Cong Series* 296: 139-140, 1973.
- 53- GARCIA-TAMAYO J, RYDER S, RYDER E: Venezuelan equine encephalomyelitis virus: structural components. *Invest Clín* 15(4): 52-61, 1974.
- 54- GARCIA-TAMAYO J, ESPARZA J: Importancia de la respuesta celular en el fenómeno encefalítico inducido por el virus de la encefalitis equina venezolana. *Patología* 16: 215-231, 1978.
- 55- GARCIA-TAMAYO J, CARREÑO G, ESPARZA J: Central nervous system alterations as sequelae of Venezuelan equine encephalitis virus infection in the rat. *J Pathol* 128: 87-91, 1979.
- 56- GAROFF H, SIMONS K, RENKONEN O: Isolation and characterization of the membrane proteins of Semliki Forest virus. *Virology* 61: 493-504, 1974.
- 57- GAROFF H, SIMONS K: Location of the spike glycoprotein in the Semliki Forest virus membrane. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 71: 3988-3992, 1974.
- 58- GASPAR DLD: Design principles in virus particle constitution. In: *Viral and Rickettsial Infections of Man*. Horsfall FL, Tamm I, edit. 4th. ed. pp. 51-93, Lippincott, Philadelphia, 1965.
- 59- GHATAK NR, POON TP, ZIMMERMAN HM: Toxoplasmosis of the central nervous system in the adult. A light and electron microscopic study. *Arch Pathol* 89: 337-348, 1970.

- 60- GLEISER CA, GOCHENNOUR WS, BERGE TO, TIGERTT WD:
The comparative pathology of Venezuelan equine encephalomyelitis
infection in different animal hosts. *J Infect Dis* 110: 80-97, 1962.
- 61- GORELKIN L: Venezuelan equine encephalomyelitis in an adult
animal host. *Amer J Pathol* 73: 425-440, 1973.
- 62- GORELKIN L, JAHRLING PB: Pancreatic involment by Venezuelan
equine encephalomyelitis virus in the hamster. *Amer J Pathol* 75:
349-362, 1974.
- 63- GRIFFIN DE, JOHNSON RT: Cellular immune response to viral
infection: in vitro studies of lymphocytes from mice infected with
Sindbis virus. *Cell Immunol* 9: 426-434, 1973.
- 64- GRIFFIN DE: Role of the immune response in age-dependent
resistance of mice to encephalitis due to Sindbis virus. *J Infect Dis*
133: 456-464, 1976.
- 65- GRIMLEY PM, BEREZESKY IK, FRIEDMAN RM: Cytoplasmic
structures associated with an arbovirus infection. Locci of viral
ribonucleic acid synthesis. *J Virol* 2: 1326-1338, 1968.
- 66- GRIMLEY PM, FRIEDMAN RM: Development of Semliki Forest
Virus in mouse brain: an electron microscopic study. *Exp Mol
Pathol* 12: 1-3, 1970.
- 67- GRIMLEY PM, LEVIN JG, BEREZESKI IK, FRIEDMAN RM:
Specific membranous structures associated with the replication of
group A arbovirus. *J Virol* 10: 492-503, 1972.
- 68- HALL CE, NISONOFF A, SLATTER HS: Electron microscopic
observations of rabbit antibodies. *J Biochem Cytol* 6: 407-411, 1959.
- 69- HARRISON SC, DAVID A, JUMBLATT J, DARNELL JE: Lipid
and protein organization in Sindbis virus. *J Mol Biol* 60: 523-528,
1971.
- 70- HAUSEN HA, GOOD RA: Malignant disease of the lymphoid sys-
tem in immunological perspective. *Human Path* 5: 567-599, 1974.
- 71- HIGASHI N, MATSUMOTO A, TABATA K, NAGAMOTO Y:
Electron microscopic study of development of Chikungunya virus
in green monkey kidney stable (VERO) cells. *Virology* 33: 55-59,
1967.
- 72- HIGASHI H: Virology I. In: Proceedings of the First International
Congress for Virology p. 49. Melnick JL. eds. Basel, 1969.

- 75--HOLMES IH: Morphological similarity of Bunyanwera supergroup viruses. *Virology* 43: 708-712, 1971.
- 74--HORZINEK M, MUNZ K: Structural constituents of Venezuelan equine encephalitis virus. *Arch fur des ges Virusforsch* 27: 94-108, 1969.
- 75--HORZINEK M, MUSSGAY M: Studies on the nucleocapsid structure of a group A arbovirus. *J Virol* 4: 514-520, 1969.
- 76--HORZINEK MC: The structure of Togavirus. *Prog Med Virol* 16: 109-165, 1973.
- 77--HUANG SN, GROH V, BEAUDOIN JG, DAUPHINE WE, GUTTMANN RD, MOREHOUSE DD, ARNOFF A, GAULT H: A study of the relationship of virus like particles and Australia antigen in liver. *Human Pathol* 5: 209-222, 1974.
- 78--HUGES D, RAINE CS, FIEDD EJ: Invasion of neurons in vitro by non-immune lymphocytes: an electron microscopy study. *Brit J Exp Pathol* 49: 356-359, 1968.
- 79--HURST EW: Infection of the rhesus monkey and the guinea pig with the virus of equine encephalomyelitis. *J Pathol Bacteriol* 42: 271-302, 1936.
- 80--HULDT G: Experimental toxoplasmosis. Effect of corticosteroids on rabbits with varying degrees of immunity. *Acta Path Microbiol Scand* 68: 605-621, 1966.
- 81--IINUMA M, YOSHIDA T, NAGAY Y, MAENO K, MATSUMOTO S: Studies of NVD. Hemagglutinin and neuraminidase subunits of Newcastle virus disease. *Virology* 46: 663-677, 1971.
- 82--JAHRLING PB, SCHERER WF: Homogeneity of Venezuelan equine encephalitis virion populations of hamster-virulent and benign strains, including the attenuated TC 83 vaccine. *Infect Immunity* 7: 905-910, 1973.
- 83--JAHRLING PB, SCHERER WF: Histopathology and distribution of viral antigens in hamster infected with virulent and benign Venezuelan encephalitis viruses. *Amer J Pathol* 72: 25-38, 1973.
- 84--JAHRLING PB, GORELKIN L: Selective clearance of a benign clone of Venezuelan equine encephalitis virus from hamster plasma by hepatic reticuloendothelial cells. *J Infect Dis* 132: 667-676, 1975.

- 85— JAHRLING PB, DEPAOLI A, POWANDA MC: Pathogenesis of a Venezuelan encephalitis virus strain lethal for adult white rats. *J Med Virol* 2: 109-116, 1978.
- 86— JOHNSON RT: Virus invasion of the central nervous system. A study of Sindbis virus infection in the mouse using fluorescent antibody. *Amer J Pathol* 46: 929-943, 1965.
- 87— JOHNSON RT, McFARLAND HF, LEVY SE: Age dependent resistance to viral encephalitis: studies of infections due to Sindbis virus infection in mice. *J Infect Dis* 125: 257-262, 1972.
- 88— JONES KJ, WAITE MRF, BOSE HR: Cleave of viral envelope precursor during the morphogenesis in Sindbis virus. *J Virol* 13: 809-817, 1974.
- 89— JONES SR: Toxoplasmosis: a review. *J Amer Vet Med Ass* 169: 1038-1042, 1973.
- 90— KISSLING RE, CHAMBERLAIN RW, NELSON DB, STAMM AD: Venezuelan equine encephalomyelitis in horses. *Amer J Hyg* 69: 274-287, 1956.
- 91— KUBES V, RIOS FA: The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. *Science* 90: 20-21, 1939.
- 92— LAINSON R: Observations on the development and nature of pseudocysts of *Toxoplasma gondii*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 52: 396-407, 1958.
- 93— LASCANO EF, BERRIA MI, BARRERA-ORO JG: Morphogenesis of Aura virus. *J Virol* 4: 271-282, 1969.
- 94— LENNAR J, CAMPANS RW: The membrane structures of lipid containing viruses. *Biochem Biophys Acta* 344: 51-94, 1974.
- 95— LEON AC, JARAMILLO R, MARTINEZ S, FERNANDEZ D, TELLEZ H, LASSO B, DE GUZMAN R: Sequelae of Venezuelan equine encephalitis in humans; a four year follow up. *Int J Epidemiol* 4: 131-140, 1975.
- 96— LUNA MA, LICHTIGER B: Disseminated toxoplasmosis and cytomegalovirus infection complicating Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 55: 499-505, 1971.
- 97— MALLUCI L, ALLISON AC: Lysosomal enzymes in cell infected with cytophatic and non cytophatic viruses. *J Exp Med* 121: 477-485, 1965.

- 98—MARKER SC, ASCHER MS: Specific in vitro lymphocyte transformation with Venezuelan equine encephalitis virus. *Cell Immunol* 23: 32-38, 1976.
- 99—MATSUBAYASHI A, AKAO S: Morphologic studies on the development of *Toxoplasma* cyst. *Am J Trop Med Hyg* 12: 321-333, 1963.
- 100—MATTHEWS MA, KRUGER L: Electron microscopy of non neuronal cellular changes accompanying neural degeneration in thalamic nuclei of the rabbit. II. Reactive elements within the neuropil. *J Neurol* 148: 311-346, 1973.
- 101—MAXWELL DS, KRUGER L: Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation. *Exp Neurol* 12: 33-54, 1965.
- 102—McFARLAND HF, GRIFFIN DE, JOHNSON RT: Specificity of the inflammatory response in viral encephalitis. *J Med* 136: 216-226, 1972.
- 103—McFARLAND HF: In vitro studies of cell-mediated immunity in an acute viral infection. *J Immunol* 133: 173-180, 1974.
- 104—MENSER MA, REYE RKD. The pathology of congenital rubella: A review written by request. *Pathology* 6: 215-222, 1974.
- 105—MINS CA: The invasion of the brain by yellow fever virus present in the blood of mice. *Brit Exp Pathol* 38: 329-338, 1957.
- 106—MORGAN C, HOWE C, ROSE HM: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Western equine encephalomyelitis virus. *J Exp* 113: 219-234, 1961.
- 107—MURPHY FA, COLEMAN PH, HARRISON AK, GARY GW: Colorado tick fever virus: an electron microscopy study. *Virology* 35: 28-40, 1968.
- 108—MURPHY FA, WHITFIELD S: Eastern equine encephalitis virus infection: electron microscopic studies of mouse central nervous system. *Exp Mol Pathol* 13: 131-146, 1970.
- 109—MURPHY FA, HARRISON AK: The virus: morphology and morphogenesis, Venezuelan encephalitis. Pan American Health Organization Scientific Publication N° 243, Washington 1972.
- 110—MURPHY FA, TAYLOR WP, MINS CA, MARHALL ID: Pathogenesis of Roos river virus infection in mice. II. Muscle, heart and brown fat lesions. *J Infect Dis* 127: 129-138, 1973.

- 111—MUSSGAY M, WEIBEL J: Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan equine encephalitis virus in KB cells. *Virology* 16: 52-67, 1962.
- 112—NARAYAN KS, ROUND DE: Minute ring shaped particles in cultured cells of malignant origin. *Nature New Biol* 243: 146-150, 1973.
- 113—NEGRETTE A: Encefalitis epidémica. *Invest Clín* 1: 12-34, 1960.
- 114—NEGRETTE A: Encefalitis equina venezolana. Manifestaciones clínicas iniciales. *Invest Clín* 4(5): 51-57, 1963.
- 115—NEGRETTE A: Encefalitis equina venezolana. Leucocitos vacuolados. *Invest Clín* 9(26): 97-107, 1968.
- 116—NOVIKOFF AB, ESSNER E, QUINTANA N: Golgi apparatus and lysosomes. *Fed Prod* 23: 1010-1022, 1963.
- 117—NUÑEZ-MONTIEL O, MUSSGAY M, WEIBEL J: Citopatología de la infección con Reovirus y virus de la EEV en células cultivadas. *Rev Lat Anat Pat* 6: 1-17, 1962.
- 118—ORNOY A, SEGAL S, NISHMI M, SIMCHA A, POLISHUK WZ: Fetal and placental pathology in gestational rubella. *Am J Obst Gyn* 116: 949-956, 1973.
- 119—OSTERRIETH PM, CALBER-BACO CM: Changes in morphology infectivity and hemmaglutinating activity of Semliki Forest virus produced by Caseinase C from *Streptomyces albus* G. *J Gen Microbiol* 43: 19-30, 1966.
- 120—PARK-HOUSE KME, ASKONAS B, DOURMASHKIN RR: Electron microscopic studies of mouse immunoglobulin M: structure and reconstitution following reduction. *Immunology* 18: 574-584, 1970.
- 121—PATHASK S, WEBB HE: Possible mechanisms for the transport of Semliki Forest virus into and within mouse brain. *J Neurol Sci* 23: 175-184, 1974.
- 122—PECK RD, BROWN A, WUST CJ: Preliminary evidence of cell mediated immunity in cross-protection among group A arbovirus. *J Immunol* 114: 581-584, 1975.
- 123—PEDERSEN JUN CE, SAGIK BP: Sindbis virus maturation. *J Gen Virol* 18: 375-379, 1973.

- 124-RABINOWITZ SG, PROCTOR RA: In vitro study of antiviral activity of immune spleen cells in experimental Venezuelan equine encephalomyelitis infection in mice. *J Immunol* 112: 1070-1077, 1974.
- 125-RENKONEN O, KARIAINEN L, SIMONS K, GAHMBERG CG: The lipid class composition of Semliki Forest virus and the plasma membrane of host cells. *Virology* 46: 318-326, 1971.
- 126-RODRIGUEZ G, ROMERO M, TORO G, BUITRAGO B: Encefalitis equina venezolana. *Histopatología de la infección natural y experimental en el hamster. Rev Lat Pathol* 11: 85-96, 1972.
- 127-RODRIGUEZ G: Morphological change in the pancreas of the hamster during Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection. *Patología* 13: 297-310, 1975.
- 128-RORKE LB, SPIRO AJ: Cerebral lesions in congenital rubella syndrome. *J Pediat* 70: 243-255, 1967.
- 129-RYDER S: Encefalitis equina venezolana. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad entre 1962 y 1971, en la Guajira Venezolana. *Invest Clín* 12(37): 7-63, 1971.
- 130-RYDER S, FINOL LT, SOTO-ESCALONA A: Encefalitis equina venezolana. Comentarios acerca de la epidemia ocurrida en el Estado Zulia, Venezuela a fines de 1969, en la Guajira Venezolana. *Invest Clín* 13(3): 91-141, 1972.
- 131-SAN MARTIN-BARBERI C, GROOT H, OSONO MESA E: Human epidemic in Colombia caused by Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Amer J Trop Med Hyg* 8: 346-348, 1979.
- 132-SCHAFFER W, LANGE J, FISHENGER PJ, FRANK H, BOLOGNESI DP, PISTER: Properties of mouse leukemia virus. I. Isolation of virus components. *Virology* 47: 210-228, 1972.
- 133-SEFTON BJ, BURGESS BW: Biosynthesis of the Sindbis virus carbohydrates. *J Virol* 12: 1366-1374, 1974.
- 134-SEFTON B, KEEGSTRA K: Glycoproteins of Sindbis virus: preliminary characterization of the oligosaccharides. *J Virol* 14: 522-530, 1974.
- 135-SELLERS RF, BERGOLD GH, SUAREZ OM, MORALES A: Investigations during Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 14: 460-469, 1965.

- 136—SCHESLINGER MJ, SCHESLINGER S, BURGESS BW: Identification of a second glycoprotein in Sindbis virus. *Virology* 47: 539-541, 1972.
- 137—SHINEFIELD HR, TOWNSEND TE: Transplacental transmission of Western equine encephalomyelitis. *J Pediat* 43: 21-25, 1953.
- 138—SIMPSON WR, HAUSER RE: Structural differentiation of Group A arbovirus based on nucleoid morphology in ultrathin sections. *Virology* 34: 568-570, 1968.
- 139—SINGER SJ, NICOLSON GL: The fluid mosaic model of the structures of cell membranes. *Science* 175: 720-731, 1973.
- 140—SOTO T, FRIENDS C, STACKPOLE C, HARVEN E: Coating of friend leukemia virus after treatment with specific antiserum. *Cancer Res* 32: 2670-2678, 1972.
- 141—SOTO ESCALONA A, FINOL LT, RYDER S: Estudio de un brote de encefalitis equina venezolana en el Distrito Páez Estado Zulia en Octubre de 1968. *Invest Clín* 10(31): 45-57, 1969.
- 142—SOUTHAN CM, SHIPKEY FH, BABOCK BI, BALLEY RB, ERLANSON RA: Virus biographies. I. Growth of West Nile and Guaroa viruses in tissue culture. *J Bacteriol* 88: 187-199, 1964.
- 143—SPERTZEL RO, CRABBS CL, VAUGHN RE: Transplacental transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in mice. *Infect Immunity* 6: 339-343, 1972.
- 144—STRAUSS JH, BURGE BW, DARNELL JE: Carbohydrate content of the membrane protein of Sindbis virus. *J Mol Biol* 47: 437-448, 1970.
- 145—TASKER JB, MIESSE MI, BERGE TO: Studies of the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis. III. Distribution of tissue of experimentally infected mice. *Amer J Trop Med Hyg* 6: 844-850, 1962.
- 146—TILLACK TW, SCOTT RE, MARCHESI VT: The structure of erythrocyte membrane studied by freeze-etching. *J Exp Med* 135: 1209-1227, 1972.
- 147—TOUNDRY G, SMITH ON: Fetal rubella pathology. *J Pediat* 68: 867-872, 1966.
- 148—VASQUEZ C: Morphology of Reovirus structural components. *J de Microscopie* 14: 219-222, 1972.

- 149– VICTOR J, SMITH DC, POLLACK AD: The comparative pathology of Venezuelan equine encephalomyelitis. *J Infect Dis* 98: 55-66, 1956.
- 150– VIETZKE WM: Toxoplasmosis complicating malignancy. *Cancer* 21: 816-827, 1968.
- 151– VON BONSDORFF CH: Structural role of RNA in Semliki Forest virus nucleocapsid. *Acta Pathol Microbiol Scand Section B* 80: 579-588, 1972.
- 152– VON BONSDORFF CH: The structure of Semliki Forest virus. *Comment Biologicae* 74: 1-53, 1973.
- 153– VON BONSDORFF CH, HARRISON SC: Sindbis virus glycoproteins form a regular icosahedral surface lattice. *J Virol* 16: 141-145, 1975.
- 154– WALKER DH, HARRISON A, MURPHY K, FLEMISTER M, MURPHY FA: Lymphoreticular and myeloid pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis in hamsters. *Am J Path* 84: 351-370, 1976.
- 155– WENGER F: Hallazgos de anatomía patológica en la reciente epidemia de encefalitis equina venezolana. *Invest Clín* 4(7): 21-45, 1963.
- 156– WENGER F: Necrosis cerebral masiva del feto en un caso de encefalitis equina venezolana. *Invest Clín* 8(21): 13-31, 1967.
- 157– WENGER F: Venezuelan equine encephalitis. *Teratology* 16: 359-362, 1977.
- 158– WICTOR TJ, KUWERT E, KOPROWSKI H: Immune lysis of rabies virus infect cells. *J Immunol* 101: 1271-1282, 1968.
- 159– YASUSUMI C, TSUBO I: Analysis of the development of Japanese B encephalitis virus. II. Electron Microscopic study of neurons infected by Japanese B virus. *J Ultrastructure Res* 12: 314-316, 1965.
- 160– YOUNG NA, JOHNSON KM, GAULD LW: Viruses of the Venezuelan equine in panamanian rodents. *Amer J Trop Med Hyg* 18: 290-296, 1972.
- 161– ZLOTNIK I, GRANT DP, BATTER-HATTON D: Encephalopathy in mice following innaparent Semliki Forest virus infection. *Brit J Exp Pathol* 53: 125, 1972.

162-ZLOTNIK I, GRANT DP, CARTER L: Experimental infection of monkeys with viruses of the tick-borne encephalitis complex: degenerative cerebellar lesions following inapparent forms of the disease after recovery from clinical encephalitis. Brit J Exp Pathol 57: 200-210, 1976.
