

ALTERACIONES FETO-PLACENTARIAS INDUCIDAS EN RATAS POR LA CEPA TC 83 DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA

Fátima de Freites, Ana Garcés, Jorge García Tamayo

Sección de Microscopía Electrónica. Instituto Anatomopatológico. Universidad Central de Venezuela. Apartado de Correos 50647. Caracas. Venezuela.

RESUMEN

El estudio macroscópico y microscópico de los fetos de ratas Sprague-Dawley inoculadas con el virus de la EEV, cepa Guajira y cepa atenuada TC 83 demostró, durante la primera semana de gestación, muerte y reabsorción de todos los fetos con cepa Guajira y una disminución considerable en el número de crías, cuando se inocularon con la cepa TC-83. El estudio histológico del sistema nervioso central de las crías nacidas vivas no demostró lesiones.

Ratas inoculadas al 4to. y 7mo. día de gestación con TC-83 y sacrificadas el día 15 de la gestación mostraron lesiones placentarias, principalmente en los vasos miometriales en los fetos de aspecto viable, así como muerte y necrosis de otros fetos. Se compara la patogenia de la infección con el virus de la EEV a las lesiones inducidas en humanos por el virus de la rubeola y con estudios previos sobre el efecto intrauterino de otros Togavirus, y se destaca la necesidad de examinar cuidadosamente a las mujeres embarazadas y a sus hijos en las áreas de

riesgo epidémico así como proscribir el uso de la vacuna TC 83 durante la gestación.

INTRODUCCION

La encefalitis equina venezolana (EEV) ha venido presentándose en el país causando brotes epizooticos y epidémicos desde hace varias décadas, principalmente en la Guajira venezolana (4, 37, 39), pero fué en 1962 (4, 38) cuando realmente llamó la atención como problema humano a raíz de la grave epidemia de EEV registrada entre los meses de Octubre y Noviembre de ese mismo año. Durante las epizootias de encefalitis equina venezolana, los caballos son las víctimas principales, aunque se ha visto que los burros y las mulas son también, clínicamente susceptibles a la infección (4, 23, 29, 38, 41). En el hombre, la enfermedad es generalmente benigna y de baja mortalidad aún cuando se han reportado casos fatales que acompañan las epizootias y brotes epidémicos descritos en diferentes países (23, 24).

En 1963 (43) y 1967 (44) Wenger describió necrosis cerebral masiva en fetos, hijos de madres que habían sufrido de EEV durante el embarazo. Esto planteó el posible efecto teratogénico de este virus.

Experimentalmente es difícil reproducir este tipo de infección in útero porque el virus de la encefalitis equina venezolana es letal para casi todos los animales de laboratorio, como ratones, cobayos, conejos y hamsters (14, 15, 16, 24, 42). En 1979 (18) se publicó un trabajo sobre lesiones cerebrales inducidas en ratas blancas que sobrevivían a la infección con el virus de la EEV. En 1981 (20) se propuso que este modelo experimental en ratas Sprague-Dawley podía servir para reproducir las posibles lesiones intrauterinas producidas por el virus de la encefalitis equina venezolana en humanos. Aunque no es mucho lo que se conoce sobre la patogenia de la infección intrauterina inducida por el virus de la encefalitis equina venezolana, existen trabajos en el país (19, 21, 22) que han descrito alteraciones placentarias durante la infección con este virus, comparándolas con las ocasionadas por el virus de la rubeola (1, 35). Sin embargo, el estudio comparativo sobre el efecto teratogénico del virus de la EEV y el virus de la rubeola, debe examinar las alteraciones intrauterinas inducidas por estos virus durante toda la gestación y particularmente, durante la primera semana de gestación en la rata, que sería equivalente al primer trimestre del embarazo en la mujer. En estudios experimentales (21) ya se había señalado que la cepa Guajira del virus de la EEV provoca abortos y reabsorción de los embriones y fetos, cuando se inocula el virus durante las dos primeras semanas de gestación en las ratas. Para confirmar este hecho, en este

trabajo utilizamos inicialmente la cepa Guajira y describimos la muerte de muchos de los animales, sin obtener ningún nacimiento. Este resultado nos llevó a utilizar la cepa atenuada TC-83 del virus de la EEV, para examinar las alteraciones placentarias inducidas por el virus atenuado de la encefalitis equina venezolana, sub-tipo TC-83, en ratas inoculadas al cuarto y al séptimo día de gestación. Se comparan las alteraciones placentarias inducidas por la cepa TC-83 con las alteraciones ocasionadas por el virus de la rubeola en el humano, abriendo la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos en estos estudios con ratas preñadas, a mujeres embarazadas que adquieran la encefalitis equina venezolana durante el primer trimestre de la gestación.

MATERIAL Y METODOS

1.— VIRUS:

En la primera parte de este experimento se utilizó el virus de la encefalitis equina venezolana EEV, cepa Guajira. La cepa del virus utilizada en este estudio fue originalmente aislada en 1962 del suero de un paciente durante la epidemia de encefalitis equina venezolana en la Guajira (cepa Guajira IVIC-SH 11.75) (6, 38). El virus se utilizó después de dos pasajes en células BKH-21, seguidos por tres pasajes en cerebro de ratón lactante (38). 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 (6). (El virus atenuado de la encefalitis equina venezolana, TC-83 fue cedido por el Dr. José Esparza del Centro de Microbiología y Virología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas). La vacuna de la EEV, TC-83, es una cepa derivada de 83 pasajes seriados de la cepa virulenta de encefalitis equina venezolana Trinidad-donkey, en cultivo de células de corazón de feto de cobayo (5, 31). La vacuna de la EEV, cepa TC-83, fué usada en este experimento después de un pasaje en células Vero (células de riñón de mono verde).

1.1. Preparación de la solución stock:

Se inoculó intracerebralmente (ic) 0,01 ml de una suspensión de virus de la encefalitis equina venezolana, cepa TC-83 (IVIC) a 10 ratones lactantes de 6 días de nacidos. Se congelaron vivos 2 días post-inoculación y se les extrajo el cerebro. Se homogeneizaron los cerebros con buffer salino fosfato (PBS), el homogeneizado se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 r.p.m., el sobrenadante se separó y se repartió 0,5 ml en 37 viales, guardándose luego en el congelador a -90°C hasta su uso.

1.2. Titulación de la solución stock:

Para determinar la infectividad del virus de la encefalitis equina venezolana, cepa TC-83, se utilizó el método de plaqueo con el fin de calcular las unidades formadoras de placas (UFP), de diferentes diluciones de la solución stock. Se cultivaron fibroblastos de conejo recién nacido en 6 placas (FB-6TC), Linbro Chemical Co., New Haven, Conn) en 2 ml de un medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) obtenido de Flow Laboratorie, Laprol Scientific, USA; complementado con 5% de suero fetal bovino, 100 unidades de penicilina/ml y 100 microgrs. de streptomicina/ml. Las monocapas celulares fueron infectadas con la adición de 0,1 ml de cada una de las siguientes diluciones de la solución stock: 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Se permitió la absorción del virus por una hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las placas se cubrieron con 2 ml de EMEM complementado con 5% de suero fetal bovino, 100 unidades de penicilina/ml, 100 microgrs. de streptomicina/ml y 1% de agarosa. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 3 días, hasta que los efectos citopáticos fueron evidentes; se agregó luego una solución de formalina en PBS, para fijar la monocapa de células y virus en la placa, y se tiñó con cristal de violeta para determinar las UFP.

2.— ANIMALES:

2.1. Apareamiento de las ratas y determinación del embarazo:

En este experimento fueron utilizadas 52 ratas Sprague-Dawley, en edad reproductiva, entre 100 y 120 días de edad. Treinta y nueve ratas hembras fueron apareadas, 3 hembras con un macho en cada jaula. Diariamente se les hizo un examen vaginal a los animales, el cual consistió en tomar una muestra con agua destilada de la vagina de cada rata, para precisar la fecha de inicio de la gestación. Esto se realizó por la lectura microscópica (microscopio de luz Zeiss, utilizando aumentos de 10x y 40x) del contenido de espermatozoides en el medio vaginal. De acuerdo a este estudio, el frotis positivo indica el día 0 de inicio de la gestación; este día las ratas se separaron en jaulas individuales, se alimentaron y cuidaron, preparando así las condiciones para el parto, que se produjo entre los días 21 a 23 de gestación.

2.2. Inoculación de las ratas con la cepa Guajira:

Se utilizaron 13 ratas Sprague-Dawley de 100 a 120 días de edad; se aparearon y una vez preñadas, se inocularon intraperitonealmente (ip): 9 ratas en el séptimo día de gestación con 0,02 ml (10 UFP) de una suspensión de virus de la encefalitis equina venezolana, cepa Guajira, y 4 preñadas, del mismo lote, no fueron inoculadas y se utilizaron como controles.

2.3. Inoculación de las ratas con la cepa atenuada TC-83:

Inicialmente se inoculó intraperitonealmente 0,3 ml de la solución stock del virus TC-83 ($2,8 \times 10^9$ UFP/ml) a 10 ratas Sprague-Dawley de 100 a 120 días de edad, al séptimo día de gestación. Como controles se utilizaron 3 ratas preñadas no inoculadas. Al culminar el período de gestación (21 - 23 días), los animales recién nacidos, tanto de las ratas experimentales como de las controles, fueron pesados y medidos los días 1, 5, 10, 15 y 20 de edad. En este último día se sacrificaron a las crías para la extracción y subsiguiente estudio histológico de los cerebros.

Se inoculó intraperitonealmente 0,3 ml de solución stock del virus TC-83 ($2,8 \times 10^9$ UFP/ml) a 8 ratas Sprague-Dawley entre 100 y 120 días de edad; 4 de estas ratas fueron inoculadas al cuarto día de gestación y las otras 4 al séptimo día de gestación. Tres ratas preñadas fueron utilizadas como controles. Otra rata no preñada fue sacrificada y se le extrajo el útero para utilizarlo como control en el estudio histológico. Las ratas preñadas fueron sacrificadas a los 15 días de gestación y se les extrajo el útero para el estudio histológico.

3.— HISTOLOGIA:

El estudio histológico se hizo fijando el material en formol tamponado al 10%, se deshidrató en alcoholes y se incluyó en parafina. Los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina, y se examinaron en un microscopio de luz.

RESULTADOS

1.— Ratas inoculadas con el virus de la EEV, cepa Guajira:

Las 9 ratas inoculadas al séptimo día de gestación con la cepa Guajira, murieron cinco días después de la inoculación. Dos días después de la infección, las ratas mostraron temblores, parálisis del tren posterior, pelos erizados y anorexia, síntomas que persistieron durante dos o tres días, ocasionándoles abortos y posteriormente la muerte.

2.— Ratas inoculadas con el virus de la EEV, cepa TC-83:

2.1. Estudio histológico del sistema nervioso central en ratas de 20 días de edad:

a) Animales:

Las 10 ratas inoculadas al séptimo día de gestación con el virus-vacuna TC-83 no revelaron síntomas de enfermedad. El parto fué aparentemente

normal. Las ratas experimentales 1 y 2 no tuvieron cría. De las otras ratas, 3 crías fueron comidas por sus madres, entre los 2-4 días de nacidos; uno de estos animales mostró malformaciones congénitas, habiendo nacido con 6 patas. Debido a que la madre se lo comió al segundo día de nacido, no se le pudo hacer estudio histopatológico; sin embargo, se pesó, se midió y se le tomaron fotografías el primer día de edad (Fig. 1).



Fig. 1.— Recién nacido con 6 patas de rata inoculada al séptimo día de gestación con la cepa TC 83 del virus de la EEV.

Las otras 8 ratas tuvieron un promedio de 5 crías, cuyo peso promedio el día del nacimiento era de 7.6 grs y una talla promedio de 7 cms. Las ratas utilizadas como control tuvieron un promedio de 12 crías con un peso promedio el día del nacimiento de 7,5 grs y una talla promedio de 7,3 cms. (Tabla I).

b) Estudio microscópico:

Las crías de las ratas inoculadas al séptimo día de gestación con el virus de la EEV, cepa TC 83, fueron sacrificadas a los 20 días de edad. Cortes seriados del sistema nervioso central de 3 ratas de 20 días de edad utilizadas como control, fueron estudiados comparativamente. El estudio histológico del sistema nervioso central de las ratas experimentales y controles no mostró alteraciones.

TABLA I**CARACTERISTICAS FISICAS DE LAS CRIAS PROVENIENTES
DE RATAS CONTROLES Y EXPERIMENTALES**

	Ratas Experimentales (n = 8)	Ratas Controles (n = 3)
Número de crías	5.7 ± 2.6	12.3 ± 2.5
Peso al nacer (g)	7.55 ± 0.70	7.52 ± 0.37
Talla al nacer (cm)	7.06 ± 0.38	7.37 ± 0.47

Los valores representan el promedio ± D.E.

2.2. Estudio de las placentas y fetos a los 15 días de gestación :**2.2.1. Estudio macroscópico:**

Las ratas inoculadas intraperitonealmente al cuarto y séptimo día de gestación con el virus TC 83 y sacrificadas a los 15 días de gestación, mostraron alteraciones variables en cuanto al aspecto macroscópico de los fetos y placentas.

a) Inoculación al cuarto día de gestación:

El útero de 4 ratas inoculadas al cuarto día de gestación, mostró 5 segmentos que contenían fetos y placentas de apariencia normal, pero de menor tamaño que los observados en las ratas inoculadas al séptimo día de gestación y de las ratas utilizadas como controles (Fig. 2). Otros segmentos uterinos mostraron apariencia distendida, de tamaño menor que los descritos anteriormente, con aspecto hemorrágico y al corte, no fué posible identificar fetos viables. En una de las ratas, el útero mostró apariencia de un tubo algo distendido, con adelgazamiento de su pared, sin que se identificara ningún feto.

Los fetos de las 4 ratas inoculadas ip con el virus TC 83 al cuarto día de gestación, mostraron un tamaño y un desarrollo menores que los fetos de 4 ratas inoculadas ip al séptimo día de gestación, y de los fetos de 3 ratas utilizadas como controles (Fig. 3). Todos estos animales fueron sacrificados en la misma edad gestacional.

b) Inoculación al séptimo día de gestación:

El útero de las 4 ratas inoculadas al séptimo día de gestación, mostró un total de 11 segmentos con fetos y placentas de apariencia normal, aunque de tamaño menor que los segmentos uterinos de los fetos y las placen-



Fig. 2.— Utero de 15 días de una rata inoculada al cuarto día de gestación con la cepa TC 83 del virus de la EEV.



Fig. 3.— Comparación entre los fetos de apariencia viable de 15 días de gestación, de ratas inoculadas al cuarto (a), al séptimo (b) días de gestación y control (c).

tas de las 3 ratas utilizadas como controles, sacrificadas a la misma edad gestacional (Fig. 4). En el útero de una misma rata se observaron sitios de reabsorción de fetos, con una apariencia redondeada y tamaño variable con relación a los segmentos que contenían fetos viables. Esto fué más frecuente en los úteros de las ratas inoculadas al cuarto día de gestación, que en los úteros de las ratas inoculadas al séptimo día de gestación. Situación no observada en los úteros de las ratas utilizadas como controles, en las cuales el promedio de segmentos del útero con fetos viables, era de 12 por cada rata (Fig. 5).



Fig. 4.— Útero de una rata inoculada al séptimo día de gestación con la cepa TC 83 del virus de la EEV, sacrificada a los 15 días.

Los fetos de las ratas inoculadas al séptimo día de gestación mostraron una apariencia normal, pero existía una disminución en tamaño y desarrollo comparándolas con los fetos de las ratas utilizadas como controles. Sin embargo, estos fetos, de madres inoculadas al séptimo día de gestación, presentaron mayor desarrollo y tamaño que los fetos de las ratas inoculadas al cuarto día de preñez y sacrificadas a la misma edad gestacional (Fig. 3). Comparando los fetos de apariencia viable a los 15 días de gestación de las ratas inoculadas al día cuarto y séptimo de preñez y los controles, se notó una diferencia de aproximadamente 2-3 mm en cuanto al tamaño. Además se observó diferencias en el desarrollo de los fetos, como en los ojos y las extremidades.



Fig. 5.— Utero de 15 días de gestación de una rata utilizada como control.

2.2.2. Estudio microscópico:

El estudio histológico de las placentas y los fetos de ratas inoculadas con el virus de la EEV, cepa TC 83, al cuarto y séptimo día de gestación y sacrificadas a los 15 días, evidenciaron cambios inflamatorios y hemorrágicos en los vasos placentarios y necrosis en zonas adyacentes a ellos.

a) Inoculación al cuarto día de gestación:

El estudio histológico del cuerpo uterino que no mostró segmentos dilatados ni fetos viables, reveló dilatación muy marcada de los vasos de la pared uterina, el endometrio mostraba una apariencia laxa, y no se vieron restos placentarios. Los segmentos distendidos, de menor tamaño que los que contenían fetos de apariencia viable, mostraron varias modificaciones histológicas: en algunos segmentos se vieron restos de tejido fetal con signos de necrosis y hemorragias, en otros, la placenta mostró áreas de necrosis con infiltración de leucocitos y macrófagos y áreas de trofoblasto con signos de necrosis y grandes hemorragias (Fig. 6). El estudio microscópico de los fetos viables no evidenció ninguna alteración de carácter inflamatorio, ni áreas de necrosis.

b) Inoculación al séptimo día de gestación:

En los segmentos del cuerpo uterino de tamaño menor que los que contenían fetos viables, el estudio histológico mostró necrosis y hemorra-

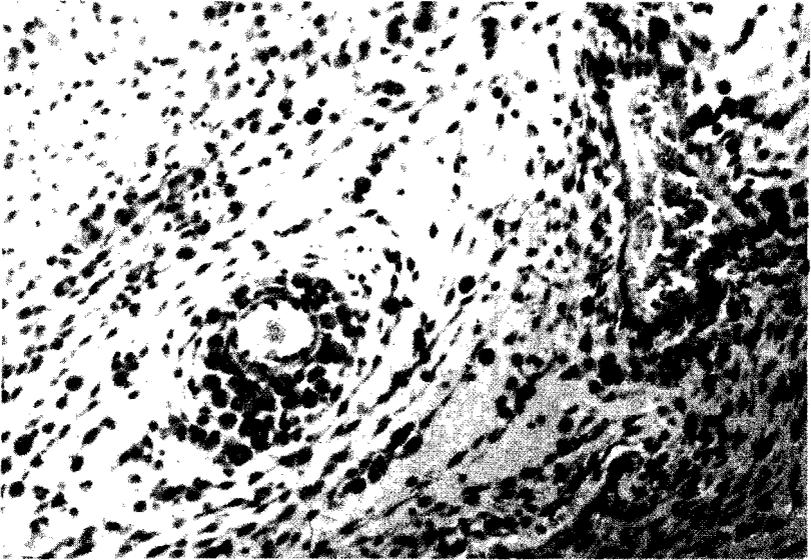


Fig. 6.— Placenta de fetos viables mostrando infiltración con leucocitos polimorfonucleares en la pared de los vasos miométriales, en las células deciduales y el trofoblasto (X 100).

gias con restos de tejido fetal y cambios inflamatorios en la placenta, principalmente en los vasos del miometrio y en la decidua, así como áreas de necrosis en el trofoblasto. El aspecto microscópico de los fetos viables no mostró ningún signo de necrosis, ni inflamación. La placenta de los fetos viables mostró infiltración con leucocitos y macrófagos en la pared de los vasos miométriales (Figuras 7 y 8) en las células deciduales y el trofoblasto. El examen cuidadoso de la pared de los vasos miométriales y deciduales mostró frecuentes células trofoblásticas tapizándolos y en muchas áreas éstos mostraban aspecto hinchado con vacuolización, ruptura de sus membranas y con infiltración de leucocitos polimorfonucleares (Figuras 9 y 10). Estos cambios fueron similares a los observados en las placentas de los fetos viables, pertenecientes a las ratas inoculadas al cuarto día de gestación.

DISCUSION

Los estudios experimentales para determinar los efectos intrauterinos ocasionados por la infección con el virus de la encefalitis equina venezolana son escasos, pero pueden tener una importancia muy significativa. Clínicamente la EEV puede manifestarse como una enfermedad febril con cefalea y malestar general que dura varios días (8, 34); los signos neuroló-

gicos son menos frecuentes, aunque han sido descritos en la mayoría de los casos durante la epidemia de EEV en la Guajira, Estado Zulia en el año 1962 (4, 8, 34).

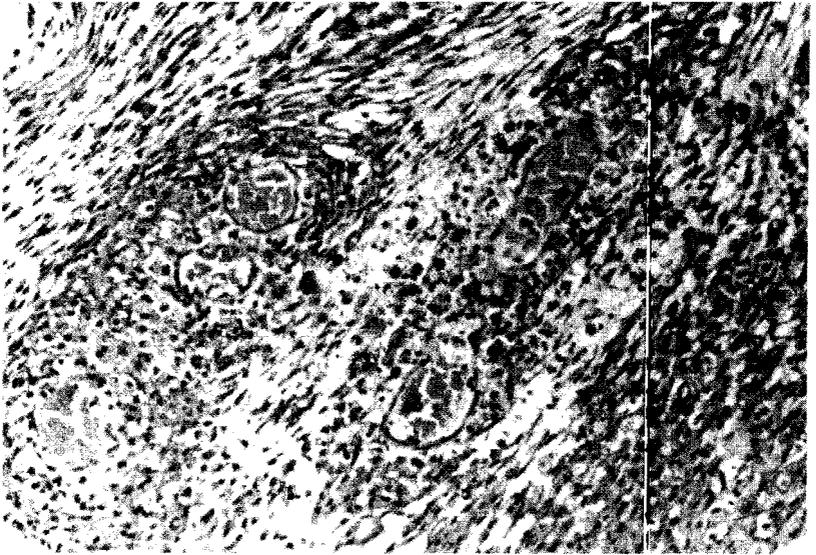


Fig. 7.— Vasculitis severa en los vasos miometriales, día 15 de gestación post inoculación con TC 83 a los 4 días. X 100.

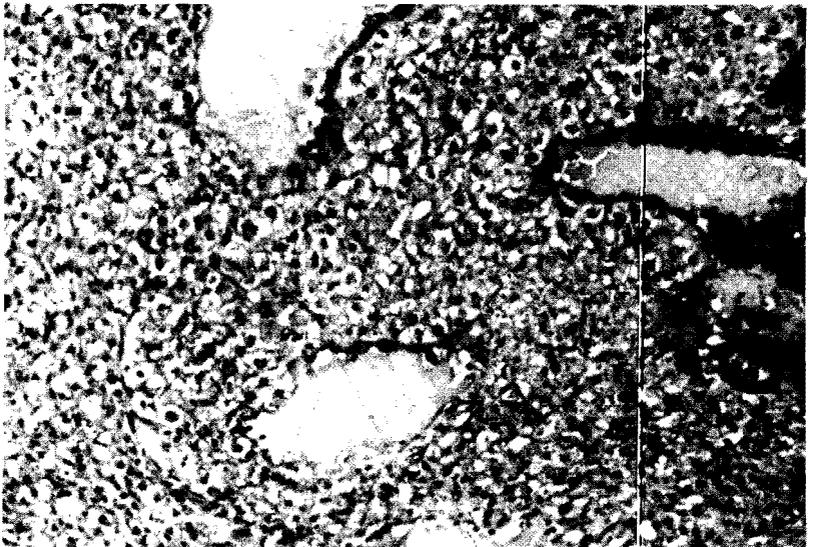
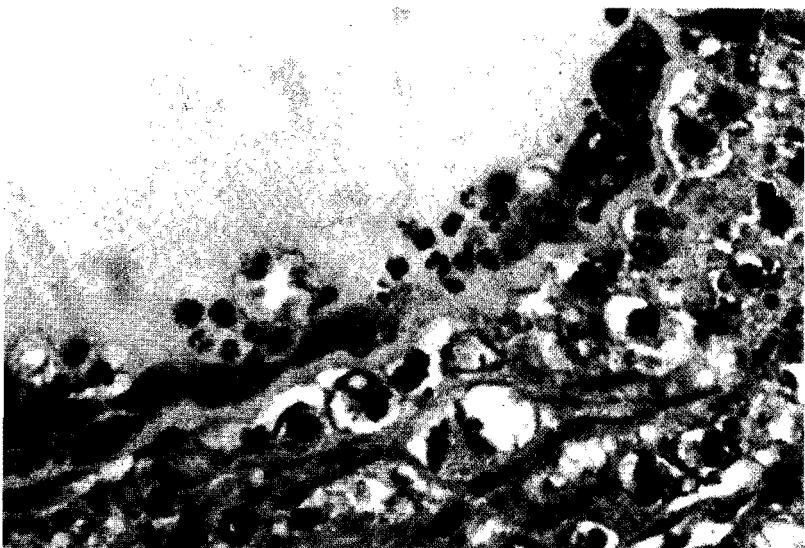
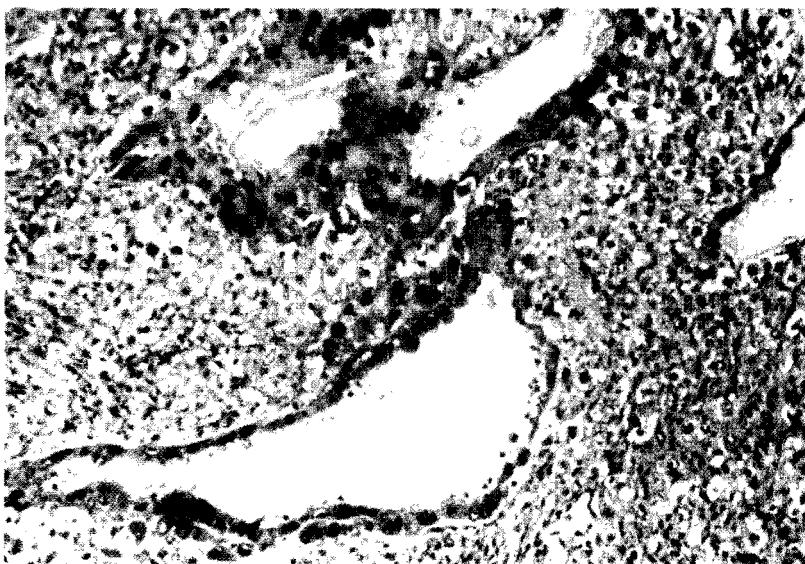


Fig. 8.— Edema de la decidua. Se observa el revestimiento de los vasos con células trofoblásticas. X 100.



Figs. 9 y 10.— Pared de los vasos miometriales y deciduales tapizados por células trofoblásticas y de aspecto hinchado con vacuolización. Se ve la ruptura de sus membranas y con infiltración de leucocitos polimorfonucleares. (9: X 100; 10: X 400).

Wenger (43, 44) ha reportado frecuentes abortos durante el primer tercio del embarazo de mujeres que habitaban al norte del Estado Zulia durante la epidemia anteriormente mencionada e igualmente, informó sobre

necrosis masiva del cerebro de fetos y recién nacidos cuyas madres sufrieron de la infección con el virus de la EEV durante el tercero a octavo mes de embarazo (43, 44). Estas informaciones dadas por Wenger no han sido confirmadas satisfactoriamente por medio de experimentos; sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio (21, 22) con la cepa Guajira del virus de la encefalitis equina venezolana, indican que la placenta es un lugar favorable para la replicación de este virus y que el daño fetal parece producirse como consecuencia de las lesiones placentarias.

En este trabajo, pudimos comprobar que la cepa atenuada del virus de la encefalitis equina venezolana, TC 83, utilizada como vacuna, provocó daños placentarios en ratas inoculadas intraperitonealmente en la primera semana de gestación.

A pesar de la imposibilidad de producir malformaciones congénitas en ratones con el virus de la EEV (40), existen estudios en mujeres embarazadas infectadas con el virus encefalítico japonés (9) y experimentos con el virus de la encefalitis de San Luis (2), los cuales han demostrado que estos virus son capaces de atravesar la placenta; y el virus encefalítico de San Luis provoca daño cerebral mínimo en ratones cuyas madres se infectaron con el virus en el octavo día de gestación (2).

En 1980 (19) señalamos que la imposibilidad de observar malformaciones fetales inducidas en las ratas por la cepa Guajira del virus de la encefalitis equina venezolana, se debió fundamentalmente a la muerte de los embriones con reabsorción durante el primer tercio de la preñez y que la infección con este virus induce en las ratas, durante la primera y segunda semana de gestación, graves lesiones fetales. Igualmente, en trabajos previos (21), reportamos cambios histopatológicos de las placentas, embriones y fetos de ratas inoculadas con la cepa Guajira del virus de la EEV. Para confirmar estos resultados y comprobar la transmisión transplacentaria con el virus de la EEV, infectamos ratas con la cepa Guajira de este virus, al séptimo día de gestación, no pudiendo obtener ningún nacimiento debido a la grave infección inducida por el virus, provocando abortos y posteriormente la muerte de las ratas; decidimos entonces utilizar la cepa atenuada del virus de la encefalitis equina venezolana TC 83 para poder examinar el efecto del virus durante las dos primeras semanas de gestación. Anteriormente London y colaboradores en 1977 (30) inocularon el virus vacuna TC 83, directamente por ruta intracerebral a fetos de monos Rhesus de aproximadamente 100 días de gestación, y describieron lesiones en el cerebro y en otros órganos de los fetos, demostrando la capacidad de esta vacuna para producir lesiones fetales; esta situación podría explicarse debido a que el sistema inmunológico de los fetos no se ha desarrollado aún; dado el hecho de que la inoculación se hizo directamente en los

fetos, la madre no adquirió la infección con la cepa TC 83 del virus de la EEV, y no le transfirió los anticuerpos correspondientes al feto, de esta manera la vacuna actúa como un antígeno capaz de producir lesiones. Jahrling y colaboradores en 1974 (25), inocularon TC 83 a hamsters con pretratamiento de cytoxan (cyclophosphamida), el cual reprime el sistema inmunológico de estos animales y se produjeron severas lesiones necrotizantes incrementando así la letalidad del virus. Debido a éstos y otros trabajos (3, 7, 11, 36), la cepa TC 83 del virus de la EEV resultó ser la más adecuada para nuestros estudios, ya que no era capaz de causar la muerte de los roedores y animales de laboratorio, tal como ocurre con otras cepas del virus de la EEV (24, 42) pero sí inducir lesiones fetales (30).

Para estudiar las alteraciones ocasionadas por el virus de la encefalitis equina venezolana, tomamos en cuenta el modelo experimental propuesto por Jahrling y colaboradores en 1978 (26), quienes observaron que las ratas blancas son relativamente resistentes a los Togavirus del grupo Alfa, y que éstos producen una baja mortalidad en ellas. Asimismo, en 1981 (20) nuestros hallazgos sugirieron a la rata blanca Sprague-Dawley como modelo experimental en la infección con el virus de la EEV y un modelo posible de inferencia en el caso de la enfermedad en humanos. Por otra parte, hemos demostrado previamente (21) que no se obtuvieron nacimientos en ratas inoculadas con la cepa Guajira del virus de la EEV, y que al estudiar la placenta, fetos y embriones, observamos áreas de necrosis en todos éstos.

En nuestros estudios histopatológicos en ratas sacrificadas a los 15 días de gestación e inoculadas al cuarto y séptimo días con TC 83, evidenciamos cambios inflamatorios y hemorrágicos en los vasos placentarios y necrosis de las zonas adyacentes a ellos, consecuencia de alteraciones vasculares iniciales como las descritas previamente en 1983 (22). Las alteraciones vasculares de la placenta humana en la infección con el virus de la rubeola (1, 13, 35) y las descritas experimentalmente en ratas inoculadas con el virus de la encefalitis equina venezolana (19, 21, 22) son muy evidentes, y han sido destacadas como el mecanismo principal implicado en la patogenia de las lesiones fetales ocasionadas por ambos virus. El virus de la EEV y el virus de la rubeola pertenecen a la familia Togaviridae (32); ambos poseen un nucleocápsido formado por ácido ribonucleico y proteínas dispuestas con arreglo similar; tanto el virus de la EEV como el de la rubeola son capaces de replicarse en la placenta y provocar daños fetales (1, 19, 21, 22, 35). La principal diferencia entre ambos consiste en que el virus de la EEV es transmitido por artrópodos y pertenece al género *Alfavirus* y el virus de la rubeola carece de un vector intermediario y es el único miembro del género *Rubivirus* (32). Recientemente hemos descrito trombosis de los vasos deciduales y necrosis placentaria en la infección con el virus de la EEV (19, 21, 22) similares a las demostradas en la placenta de

humanos durante la infección con el virus de la rubeola (1, 35). De esta manera, puede sugerirse que la patogenia del virus de la EEV en mujeres embarazadas es similar a la ocasionada por el virus de la rubeola y posiblemente ocurren alteraciones fetales similares a las descritas para la rubeola. De aquí la importancia de un estudio cuidadoso del efecto del virus de la encefalitis equina venezolana en mujeres gestantes de las áreas donde existen reservorios, muchos mosquitos, equinos y donde se han producido brotes epidémicos, ya que anteriormente se han reportado casos de necrosis en fetos cuyas madres habían padecido de EEV en la epidemia de 1962 en el Estado Zulia (43, 44).

Fox, citado por Milner y Marshall (33), reportó que la mayoría de los virus que producen infecciones en el útero tienen preferencia por el tejido placentario, y consideró que la protección dada a los fetos por la placenta es mínima y probablemente es más física que inmunológica. Trabajos experimentales recientes inoculando ratones preñados con alfavirus, demostraron la infección de la placenta, causando abortos e infecciones fetales (33). El análisis de nuestros resultados reveló una disminución en el número de crías de las madres inoculadas con la cepa atenuada del virus de la EEV durante la primera semana de gestación, en comparación con el número de crías de las ratas utilizadas como control, lo cual sugiere que ocurrieron algunos abortos, mientras que otros fetos sobrevivieron después de la inoculación. Hallazgos similares fueron descritos por Milner y Marshall (33) con la cepa T 48 del virus de Ross River; sin embargo, cuando utilizamos la cepa Guajira del virus de la encefalitis equina venezolana, no se obtuvo ningún nacimiento, debido a abortos ocurridos durante la infección aguda en las ratas, tal como lo indicamos en trabajos publicados previamente (19, 21), trabajando con la misma cepa del virus de la EEV e igualmente Milner y Marshall (33) en sus estudios realizados con una cepa avirulenta del virus Semliki Forest. La importancia de estos trabajos recientes radica en que ambos virus son Togavirus del grupo Alfa.

No nos cabe duda de que, de cada rata preñada, el número de crías que sobrevive durante la infección con el virus de la EEV dependerá de la infección de las placentas (21), la cual se produce durante la viremia de la rata. Las crías que lograron sobrevivir a la infección intrauterina con el virus de la EEV, cepa TC 83, mostraron pesos y tallas normales en comparación con las ratas utilizadas como control. Nuestros resultados demuestran que los valores de peso y talla de las crías experimentales en el transcurso de los 20 días de edad, con frecuencia son mayores que los valores de las ratas controles, debido a que las ratas experimentales son mejor alimentadas que las utilizadas como control por encontrarse en menor cantidad. Esto sugiere que las ratas recién nacidas tal vez no fueron atacadas por el virus, ya que presentaron un desarrollo aparentemente normal; sin

embargo, observamos malformaciones congénitas en una rata, la cual nació con 6 patas. London y colaboradores (30), estudiaron el efecto teratogénico del virus TC 83 en monos, y observaron malformaciones en los fetos inoculados directamente; asimismo esta malformación reportada en nuestro trabajo, pudo ser ocasionada por la infección intrauterina con la cepa atenuada TC 83, pero ésto no podemos asegurarlo. Si consideramos que estas crías provienen de las ratas inoculadas con TC 83 al séptimo día de gestación, se podría especular que si la viremia se produce dos días después de la inoculación (17) y la replicación del virus en la placenta podría demorar 24 a 48 horas, por lo que las lesiones en el embrión se producirán alrededor del día 11 de gestación, cuando las células de los somitos migran formando el esclerotomo. Pero no podemos saber si la malformación congénita descrita es producto de una alteración cromosómica, o si ésta ha sido inducida por el virus. Para dilucidar este aspecto se requiere de futuras investigaciones, utilizando mayor cantidad de animales.

Para comprobar si el virus ocasionó alguna alteración en el sistema nervioso central, se sacrificaron las crías de 20 días de edad y se estudió macroscópicamente y con estudio histológico el cerebro, el cual no evidenció malformaciones congénitas, ni necrosis como lo reportado por Wenger en humanos (43, 44). Nuestros resultados comprueban que la cepa TC 83 no produce alteraciones en el sistema nervioso central por infección intrauterina en las crías que nacen vivas y aparentemente sanas; sin embargo, Dill y colaboradores (11) reportaron alteraciones en el sistema nervioso central utilizando la cepa TC 83 en hamsters, pero Austin y Scherer (3) no describieron lesiones cerebrales ocasionadas por este virus en hamsters, resultados éstos que señalan lo controversial del efecto intrauterino del virus de la EEV dependiendo del modelo experimental que se utilice. Las lesiones en humanos (43, 44) podrían deberse a alteraciones en una etapa tardía de la gestación, como ocurre en el modelo de la infección in útero de la rata en la tercera semana de gestación (21). No obstante debe insistirse en la importancia de realizar estudios con mayor número de animales, sacrificados en diferentes épocas de la gestación para buscar malformaciones cerebrales inducidas por el virus-vacuna de la EEV.

Se ha reportado que el virus de la EEV se multiplica activamente en la placenta provocando lesiones en los vasos miometriales que ocasionan trombosis, necrosis de la placenta y daños fetales, con subsecuente muerte y reabsorción de fetos (19, 21, 22). Este mecanismo, pensamos que se produjo en los fetos que no llegaron a nacer. Para verificar esta hipótesis, sacrificamos un lote de ratas a los 15 días de gestación, de las cuales decidimos inocular 4 al cuarto día de gestación y las otras 4 al séptimo día de gestación con la cepa atenuada TC 83 del virus de la EEV. La inoculación al cuarto y al séptimo día de gestación se realizó con el fin de observar si los

daños placentarios y fetales tenían relación con el tiempo de la inoculación dentro del primer tercio de la preñez de las ratas. Si el cierre del tubo neural en la rata se produce entre el octavo y noveno día de gestación, la inoculación entre el cuarto y el séptimo día de gestación, deberá producir lesiones en el sistema nervioso central y otros órganos que están en etapa de formación en este período. Creemos importante volver a insistir en la necesidad de examinar un número mayor de animales, interrumpiendo la gestación en diferentes etapas, para verificar la presencia de malformaciones in útero. Después de sacrificar las ratas a los 15 días de gestación, se observó que los úteros, tanto de las ratas inoculadas al cuarto día, como de las ratas inoculadas al séptimo día, presentaron segmentos de menor tamaño, de aspecto hemorrágico y al corte no se identificaron fetos en estos segmentos. Los fetos de apariencia viable en las ratas inoculadas al cuarto día de gestación fueron de menor número y menor tamaño que los observados en las ratas inoculadas al séptimo día de gestación y las utilizadas como controles. De acuerdo a lo observado, podríamos inferir que las lesiones fetales dependen de la edad gestacional cuando se produce la exposición al virus como lo reportan Milner y Marshall (33), ya que fue más frecuente observar sitios de reabsorción de fetos en las ratas inoculadas al cuarto día, incluyendo en útero donde ocurrió aborto y reabsorción de todos los fetos, que las ratas inoculadas al séptimo día de gestación. No obstante, Milner y Marshall (33) señalan que los abortos son menos frecuentes mientras se infecte al feto en fases más tempranas de la gestación en ratones. Consideramos que una vez que los fetos son infectados, la muerte es inevitable. Existen fetos que no son infectados en una misma rata y esta variación de susceptibilidad en la infección in útero podría ser porque los fetos ganan inmunocompetencia durante la infección, como ya se ha reportado anteriormente (33).

Las placentas de los fetos que aparentemente eran viables, mostraron alteraciones de las paredes vasculares con necrosis en las zonas adyacentes y la invasión con leucocitos polimorfonucleares, observada en estudios anteriores (21, 22). Es importante destacar que no se observaron lesiones, ni alteraciones en los tejidos fetales. Estas infecciones placentarias sin daños fetales, pueden ser explicadas por la hipótesis de que la madre transfiere anticuerpos al feto, más que por el hecho de que la placenta actúe como una barrera física, impidiendo el paso de los virus a los fetos, apoyada por las observaciones de Milner y Marshall (33), ya que ellos basan sus resultados en la inmunización pasiva de los fetos y también se demuestra la habilidad del virus de persistir en las células trofoblásticas a pesar de la respuesta inmune de la madre (21, 22, 23), situación comparable a lo que ocurre en la infección humana con el virus de la rubeola (1) y con el virus de Ross River en ratones (33).

La posible patogenia de la infección intrauterina con el virus atenuado TC 83 de la EEV podría ser explicada por varios mecanismos: 1) que el virus se replique en la placenta y atraviese la barrera placentaria ocasionando daños fetales como se ha descrito para los parvovirus (27); 2) que los fetos se infecten a través del líquido amniótico, previa replicación del virus en la placenta y saco embrionario, como se ha reportado que ocurre con los reovirus (28); 3) que las lesiones necrotizantes de la placenta y daño fetal correspondiente sean consecuencia de las alteraciones vasculares miometriales iniciales como se ha sugerido para la cepa Guajira del virus de la EEV (22). De acuerdo a nuestros resultados, consideramos que esta última hipótesis podría ser la más aceptable para explicar nuestros hallazgos, porque el virus TC 83 es una cepa atenuada del virus de la encefalitis equina venezolana y porque las alteraciones placentarias que se encontraron fueron similares a las descritas previamente en nuestro laboratorio (19, 21, 22). En vista de que no existen trabajos que hayan examinado la replicación del virus de la EEV, cepa TC 83 en la placenta, sugerimos la necesidad de precisar por medio de estudios virológicos, la presencia del virus-vacuna en la placenta. Este tipo de estudio y su comparación con la replicación del virus en el feto, podrían aclarar el mecanismo por el cual el virus produce alteraciones y muerte de los fetos. Así mismo es importante demostrar que los fetos que sobrevivieron fueron prevenidos directamente por la transferencia pasiva de anticuerpos maternos, resultado de una "competencia" entre los anticuerpos maternos y los antígenos virales (10). La demostración de estos hechos espera por estudios multidisciplinarios sobre este modelo experimental.

El uso de la vacuna TC 83 del virus de la encefalitis equina venezolana resulta inocuo cuando es suministrada en animales (12) y humanos y adultos (3), pero cuando es inoculada a animales preñados, creemos que es capaz de inducir alteraciones placentarias, posibles malformaciones congénitas y abortos. Se ha sugerido (30) que el virus-vacuna TC 83 es teratogénico para los primates y podría serlo para el hombre. Por esto y por los resultados descritos y discutidos en este trabajo, recomendamos que la vacuna del virus de la encefalitis equina venezolana no debe ser suministrada a animales y humanos en estado de gravidez.

ABSTRACT

Fetal-placental alterations induced in rats by Venezuelan Equine Encephalitis Virus Strain TC-83. *Freites F., (Instituto Anatomopatológico. Sección de Microscopía Electrónica. Universidad Central de Venezuela. Apartado de Correos 50647. Caracas. Venezuela), Garcés A., García-Tamayo J. Invest Clín 27(1): 25-48, 1986. – Macroscopic and microscopic study of*

fetuses in Sprague-Dawley rats inoculated with Venezuelan equine encephalitis (EEV) virus Goajira and TC 83 strains, revealed death and reabsorption of all products during the first week of pregnancy when Goajira strain was inoculated and decreased number of newborn rats when TC 83 inoculation was performed. No alterations of the CNS in newborn rats were histologically demonstrated. TC 83 inoculation on the 4th and 7th days of pregnancy was performed and rats were sacrificed the 15th day of pregnancy. Placental alterations were always observed in the mesometrial arteries. Placental changes were observed in normal looking fetuses as well as in necrotic and hemorrhagic products. Pathogenic mechanism of EEV infection are compared with those described in humans with rubella virus and with the intrauterine effect of other togaviruses. The importance of the study of pregnant women and children in endemic areas and the abolition of TC 83 vaccine during pregnancy is emphasized.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ALFORD C.A., NEVA F.A., WELLER T.H.: Virologic and serologic studies of human products of conception after maternal rubella. *New Engl J Med* 271: 1275-1281, 1964.
- 2— ANDERSEN A., HANSON R.: Intrauterine infection of mice with St. Louis Encephalitis Virus: immunological, physiological, neurological and behavioral. Effects on progeny. *Infect Immunity* 12: 1173-1183, 1975.
- 3— AUSTIN F.J., SCHERER W.F.: Studies of Viral Virulence. I Growth and histopathology of virulent and attenuated strains of Venezuelan Encephalitis virus in hamsters. *Amer J Pathol* 62 (2) 195-210, 1971.
- 4— AVILAN ROVIRA J.: El brote de encefalitis equina venezolana al norte del Estado Zulia a fines de 1962. *Rev Ven Sanidad y Asistencia Social* 29: 231-321, 1964.
- 5— BERGE T., BANKS I., TIGERTT W.D.: Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in Guinea Pig heart cells. *Amer J Hyg* 73: 209-218, 1961.
- 6— BERGOLD G.H., MAZZALI R.: Plaque Formation by Arboviruses. *J Gen Virol* 2: 273-284, 1968.
- 7— CALISHER CH., MANESS K.: Virulence of Venezuelan equine encephalitis virus subtypes for various laboratory hosts. *Applied Microbiol* 28 (5): 881-884, 1974.

- 8- CASTILLO C.: Informe sobre una reciente epidemia de encefalitis equina venezolana en la zona sur del Estado Zulia. *Rev Ven del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social* 29: 325-353, 1964.
- 9- CHATURVEDI U.C., MATHUR A., CHANDRA A., DAS S.K., TANDON H.O., SINGH U.K.: Transplacental infection with japanese encephalitis virus. *The J Infect Dis* 141 (6): 712-715, 1980.
- 10- CARRETI N., OVARY Z.: Transmission of Ig antibodies from maternal. *Proc Soc Exp Biol Med* 130: 509-512. 1969.
- 11- DILL G., PEDERSON C., STOOKEY J.: A comparison of the tissue lesions produced in adult hamsters by two strains of avirulent Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Amer J Pathol* 72 (1): 13-23, 1973.
- 12- EDDY G., MARTIN D., REEVES W., JOHNSON K.: Field studies of an attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis vaccine (strains TC 83). *Infect Immunity* 5 (2): 160-163, 1972.
- 13- ELIZAN T., FABIYI A.: Congenital and neonatal anomalies linked with viral infections in experimental animals. *Amer J Obstet Gynec* 106 (1): 147-154, 1970.
- 14- GARCIA TAMAYO J.: Acid phosphatase activity in mouse brain infected with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Virol* 8 (2): 232-241, 1971.
- 15- 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.
- 16- GARCIA TAMAYO J.: Venezuelan equine encephalomyelitis virus in the heart of newborn mice. *Arch Pathol* 96: 294-297, 1973.
- 17- GARCIA TAMAYO J., ESPARZA J.: Importancia de la respuesta celular en el fenómeno encefalítico inducido por el virus de la encefalitis equina venezolana. *Invest Clín* 19 (2): 215-231, 1978.
- 18- 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.
- 19- GARCIA TAMAYO J.: Encefalitis equina venezolana experimental: Estudio histológico, histoquímico y ultraestructural. *Invest Clín* 21 (4): 277-371, 1980.

- 20- GARCIA TAMAYO J., ESPARZA J., MARTINEZ J.: Venezuelan equine encephalitis. *Comp Pathol Bullet* 13 (2): 2-4, 1981.
- 21- GARCIA TAMAYO J., ESPARZA J., MARTINEZ J.A.: Placental and fetal alterations due to Venezuelan equine encephalitis virus in rats. *Infect Immunity* 32: 813-821, 1981.
- 22- GARCIA TAMAYO J., GARCIA SAUDY DE, ESPARZA J.: Alteraciones iniciales inducidas en los vasos placentarios de la rata por el virus de la encefalitis equina venezolana. *Invest Clín* 24 (1): 3-15, 1983.
- 23- GILYARD R.T.: A clinical study of Venezuelan virus equine encephalomyelitis in Trinidad. *B.W.I. J Amer Vet Med Assoc* 106: 267, 1945.
- 24- GLEISER C.A., GOCHENOUR W.S., BERGE T.O., TIGERTT W.D.: The comparative pathology of experimental Venezuelan equine encephalomyelitis infection in different animal hosts. *J Infect Dis* 110: 80-97, 1962.
- 25- JAHRLING P., DENDY E., EDDY G.: Correlates to increased lethality of attenuated Venezuelan encephalitis virus vaccine for immunosuppressed hamsters. *Infect Immunity* 9 (5): 924-930, 1974.
- 26- JAHRLING P., DE PAOLI A., POWANDA M.: Pathogenesis of a Venezuelan encephalitis virus strain lethal for adult white rats. *J Med Virol* 2: 109-116, 1978.
- 27- KILHAM L., MARGOLIS G.: Fetal infections of hamsters, rats and mice induced with minute virus of mice (MVM). *Teratology* 4: 43-62, 1971.
- 28- KILHAM L., MARGOLIS G.: Pathogenesis of intrauterine infections in rats due to Reovirus Type 3. I.— Virologic studies, *Lab Invest* 28 (5): 597, 1973.
- 29- KUBES V.: Venezuelan - Type Equine encephalomyelitis virus in Trinidad. *Science* 99: 41-42, 1944.
- 30- LONDON W.T., LEVITT N., KENT S., WONG V., SEVER J.: Congenital cerebral and ocular malformations induced in Rhesus monkeys by Venezuelan equine encephalitis virus. *Teratology* 16: 285-296, 1977.
- 31- MCKINNEY R.W., BERGE T.O., SAWYER W.D., TIGERTT W.D., GROZIER D.: Use of an attenuated strain of Venezuelan equine en-

- cephalomyelitis virus for immunization in man. *Am J Trop Med* 12: 597-603, 1963.
- 32- MELNICK J.L.: Taxonomía de los virus. *Adel Microbiol Enf Infecc* 1: 177-224, 1982.
- 33- MILNER A., MARSHALL I.: Pathogenesis of In Utero Infections with abortogenic and Non-abortogenic alphaviruses in Mice. *J Virol* 50: 66-72, 1984.
- 34- NEGRETTE A.: Encefalitis epidémica. *Investigación Clínica* 1 (1): 13-34, 1960.
- 35- ORNOY A., SEGAL S., NISHMI M., SIMCHA A., POLISHUK W.: Fetal and placental pathology in gestational rubella. *Amer J Obst Gynec* 116 (7): 949-956, 1973.
- 36- RABINOWITZ S.; Host immune responses after administration of inactivated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccines.
- 1) Description and characterization of adoptive transfer by immune spleen cells. *J Infect Dis* 134 (1): 30-38, 1976.
- 37- RYDER S., FINOL L., SOTO A.: Anticuerpos contra encefalitis equina venezolana en la población humana del Estado Zulia en 1967, *Invest Clín* 12 (39): 37-51, 1971.
- 38- SELLERS R.F., BERGOLD G.H., SUAREZ O.M., MORALES A.: Investigations during Venezuelan equine encephalitis outbreaks in Venezuela, 1962-1964. *Amer J Trop Med Hyg* 14 (3): 460-469, 1965.
- 39- SOTO-ESCALONA A., FINOL L., RYDER S.: Estudio de un brote de encefalitis venezolana en el Distrito Páez, Estado Zulia, en Octubre de 1968. *Invest Clín* 10 (31): 45-57, 1969.
- 40- SPERTZEL R.O., CRABBS C.L., VAUGHN R.E.: Transplacental transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in mice. *Infect Immunity* 6 (3): 339-343, 1972.
- 41- TIGERTT W.D., DOWNS W.: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalitis in Trinidad. *Amer J Trop Med Hyg* 11: 822-834, 1962.
- 42- VICTOR J., SMITH D., POLLACK A.: The comparative pathology of Venezuelan equine encephalomyelitis. *J Infect Dis* 98: 55-66, 195.

- 43— WENGER F.: Hallazgos de Anatomía Patológica en la reciente epidemia de encefalitis equina venezolana. Invest Clín 4 (7): 21-45, 1963.
- 44— WENGER F.: Necrosis cerebral masiva del feto en caso de encefalitis equina venezolana. Invest Clín 8 (21): 13-31, 1967
-