

Encefalitis equina experimental. Estudio histológico, histoquímico 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 las 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 la luz el bazo y el cerebro de ratas inoculadas por la vía ip con el virus de la EEV y se discuten 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, 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 patogenético similar al descrito con el virus de la rubeola.

Experimental Venezuelan Equine Encephalitis: histologic, histochemical and ultrastructural study.

Invest Clin 21(4): 277-371, 1980.

Abstract 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 tortuos 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 ATPase 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.

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, procedido por una epizootia de equinos en la región de la Guajira venezolana; se reportan 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 diseccionando 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 pre-

sentar 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 infección 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 cere-

bral en estos animales, está expresada en la discusión de aspectos inmunológicos cuyo valor real en ambas infecciones no están claramente establecidos (4, 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 patogénéticos 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 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 anima-

les 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 el sistema nervioso. Para el estudio con el microscopio electrónico, se cortaron pequeños fragmentos de cerebro, bazo, hígado 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 periodos 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 0,1M de cacodilato de sodio fría, con 7,5 gr. de sacarosa por ml, y los fragmentos se llevaron al criostato para ser 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 substrato beta glicerofosfato de sodio. Después de la incubación en 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%. Previo 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

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-hidroximetilamino-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 homogenizó 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 ultracentrifuga 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 dos 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) Microscopia electrónica (ME). Muestras de las diferentes fracciones aisladas se tiñeron con una so-

lución 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 del 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 (1.4a). 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 1.4c.

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

diez primeros días 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 6to y el 8vo 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 machos, 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 en 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 y 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, Tricrómica 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 200 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.- 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 del 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 adoptan 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 aspectos 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 osmiofilico 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 pe-

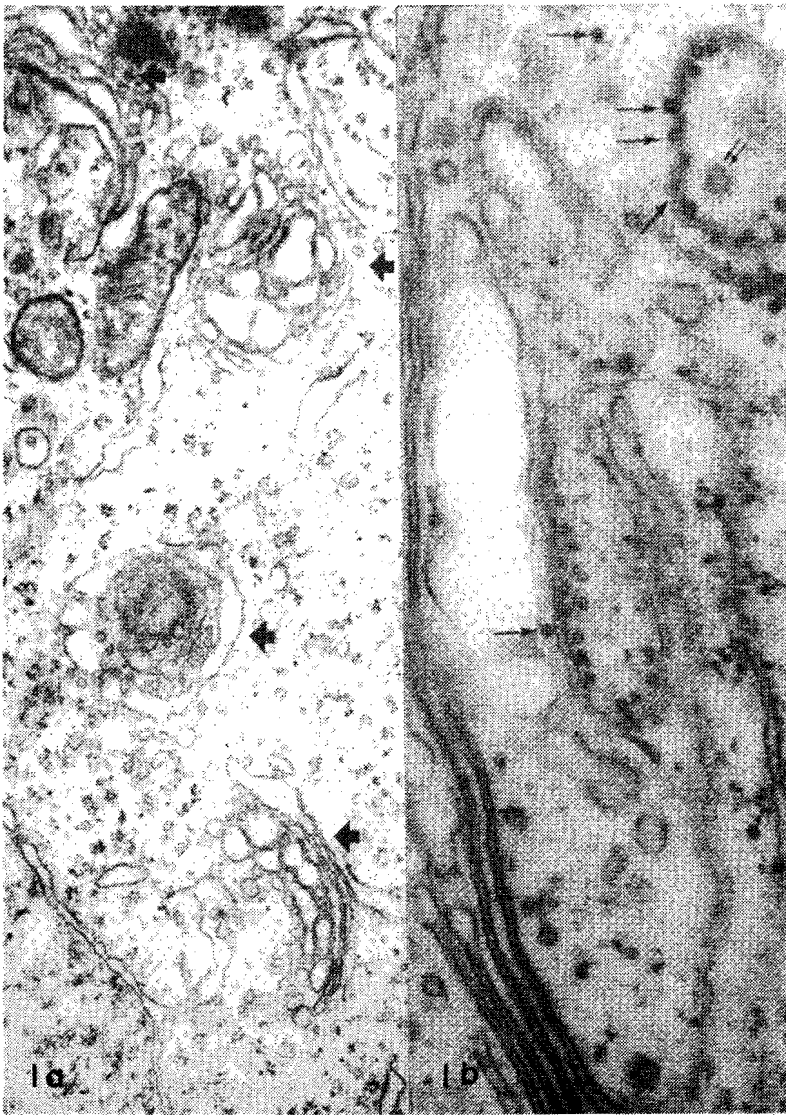


Fig 1. Cerebro de ratón recién nacido 24 horas post inoculación intracerebral con virus de la EEV, cepa Guajira. a) Proliferación de los aparatos de Golgi en el citoplasma de una neurona (flechas) 27.000 X. b) Aparato de Golgi con cisternas tubulares a cuya membrana se adhieren nucleocápsidos (flechas).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

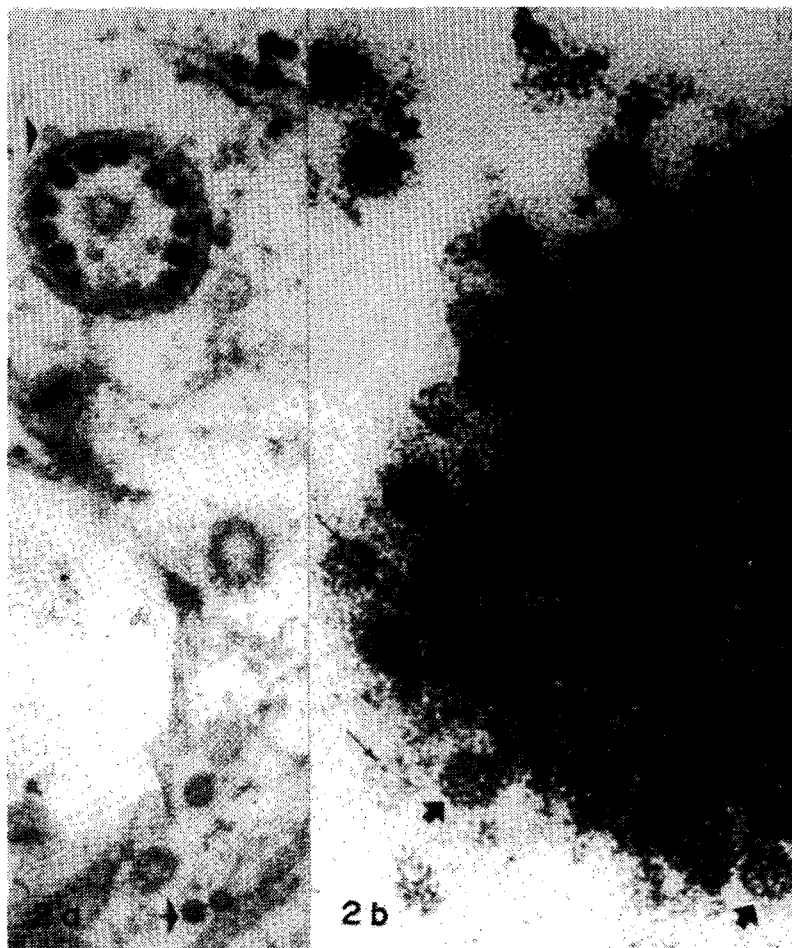


Fig 2. a) Cisterna circular con nucleocápsidos adheridos a la membrana y libres en el citoplasma (cabezas de flechas). 106.250 X. b) Area de viroplasma y nucleocápsidos. Las flechas gruesas señalan algunos nucleocápsidos en los cuales se ven subunidades que les dan una apariencia moteada. Las flechas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

riaxónicos, las partículas virales se agrupaban con frecuencia en forma paracrística, uniéndose entre ellas por sus finas espículas, en forma de malla linealmente (Figs. 5a, 5b). Ocasionalmente se vieron par-

tículas 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

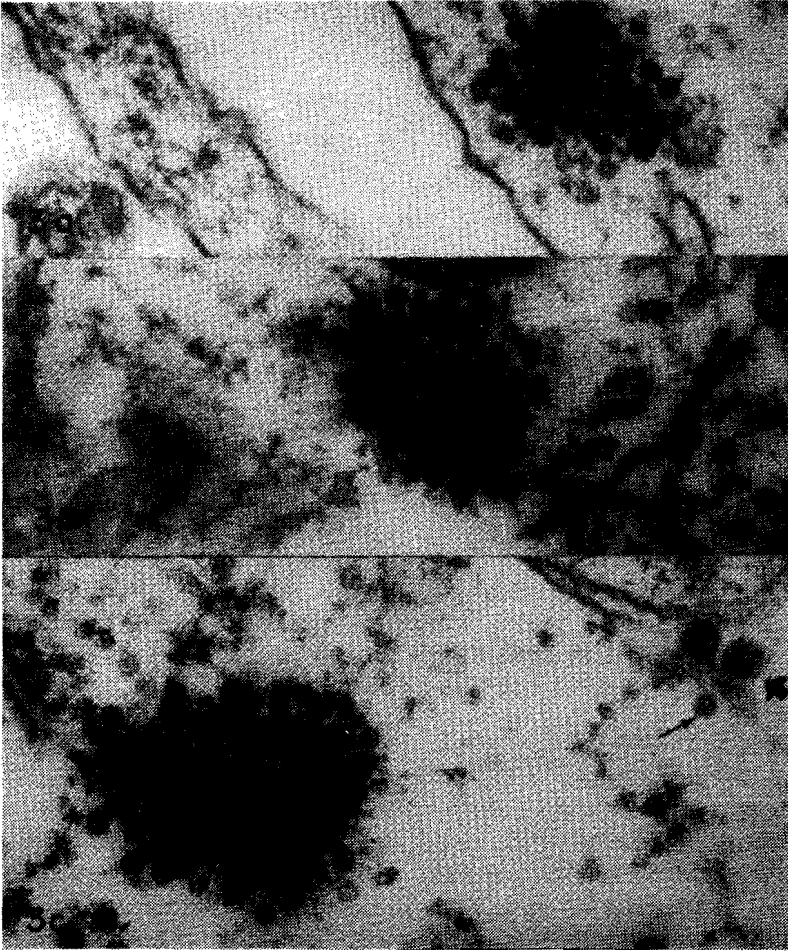


Fig. 3. a, b, c. Se muestran diversos estadios en la formación de los nucleocápsidos alrededor de las áreas de viroplasma. En la figura 3c, la flecha simple señala un nucleocápsido y la gruesa dos partículas en la fase final del fenómeno de gemación. 106.250 X.

de las partículas virales (Fig. 6). En la luz de los vasos sanguíneos se vieron partículas virales en las cuales eran también muy evidentes las espículas de su envoltura (Fig. 7).

b) Replicación del virus en el miocardio. Algunas fibras miocár-

dicas 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

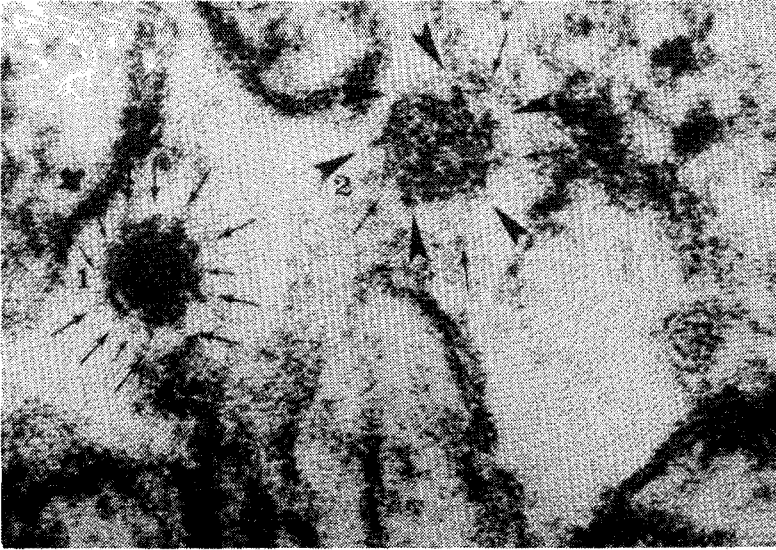


Fig. 4. Partícula del virus de la EEV con espícula en su envoltura. Los viriones han sido señalados con números para su identificación. PV1: En la vecindad de la membrana plasmática señalada por la flecha gruesa. Las flechas simples señalan 12 proyecciones espiculares superficiales, algunas más prominentes 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.

sarcoplasmático o formando vacuolas debajo del sarcolema. Se vieron polisomas con organización helicoidal. En el sarcoplasma 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 polimor-

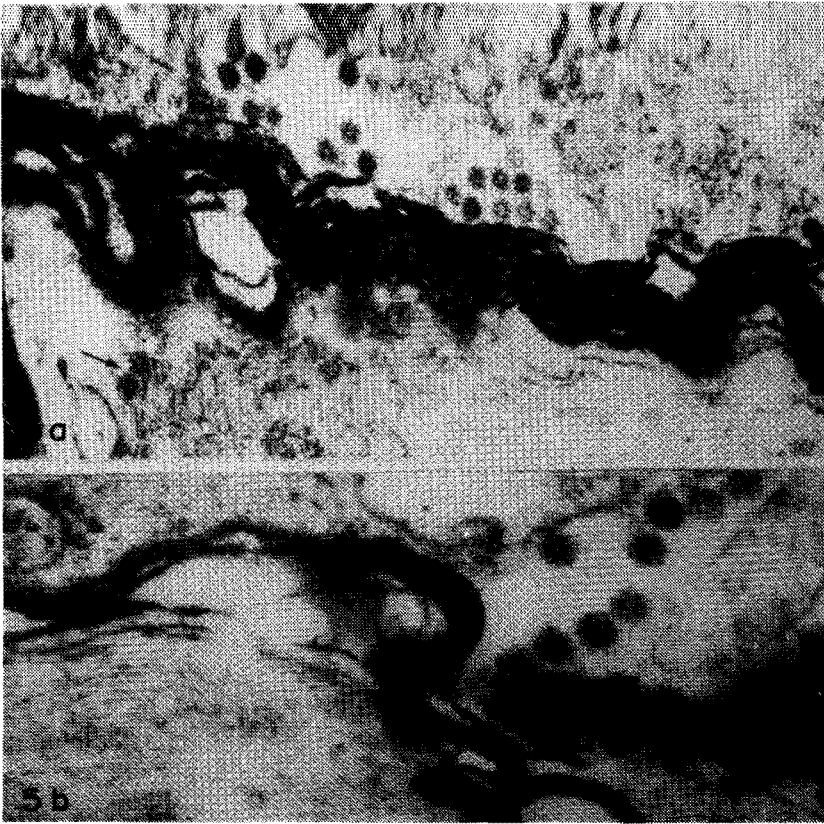


Fig. 5. a) Partículas virales en el espacio periaxónico unidas por sus espículas muy simétricamente. La flecha señalada dos viriones en el axoplasma. 60.000 X. b) Agrupación lineal de partículas del virus de la EEV en los espacios intercelulares del tejido nervioso. Nótese la unión a través de sus espículas.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

fonucleares; ésto fué particularmente observado a nivel de los sinusoides 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 pre-

sentaban 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 de ser áreas de rarefacción del citoplasma donde ocasionalmente se vieron partículas

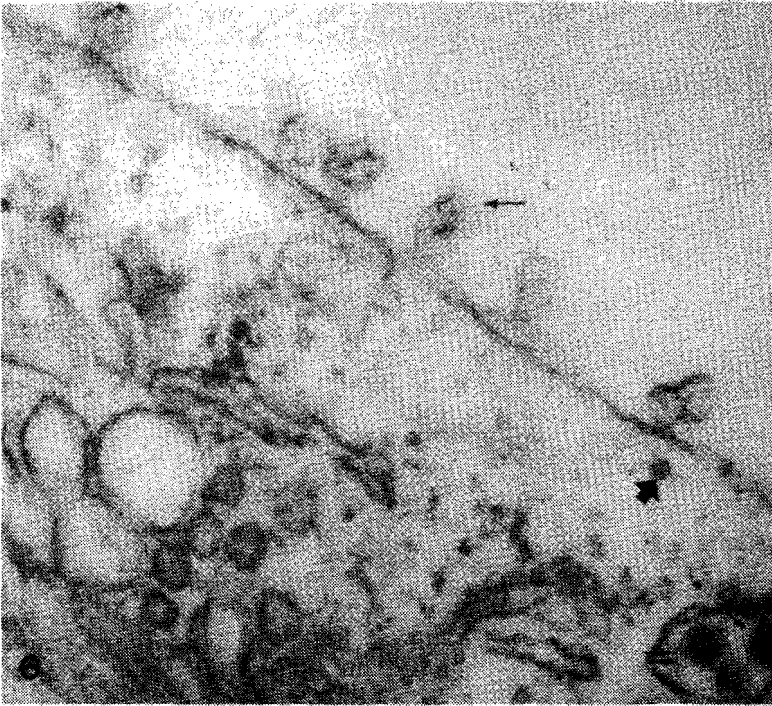


Fig.6. Vesículas en la membrana plasmática de una neurona (flecha simple) que muestra nucleocápsido (flecha gruesa) cerca de las cisternas y vesículas del aparato de Golgi y de la membrana plasmática. Las flechas dobles señalan partículas virales dentro de una vacuola. 106.250 X.

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. La 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 mostraron vesícu-

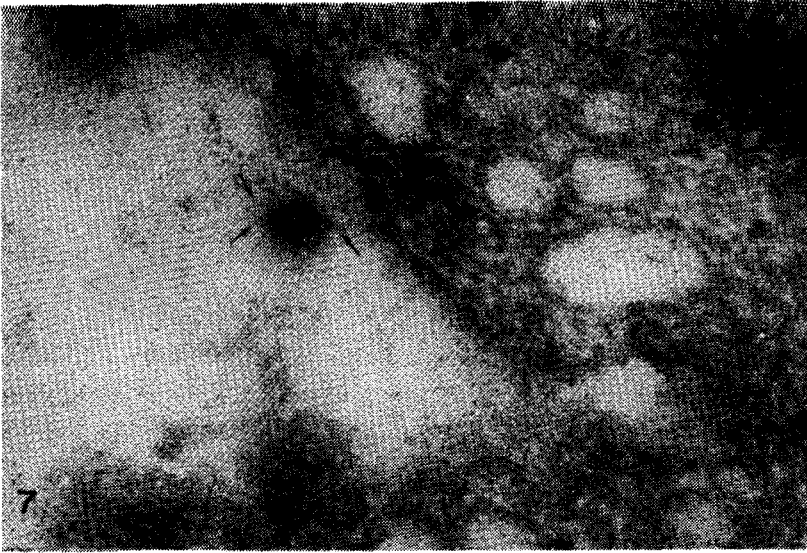


Fig. 7. Virus de la EEV en la luz de un vaso sanguíneo y cercano al endotelio que muestra vesículas de pinocitosis. Las flechas señalan las espículas en la envoltura viral. 162.500 X.

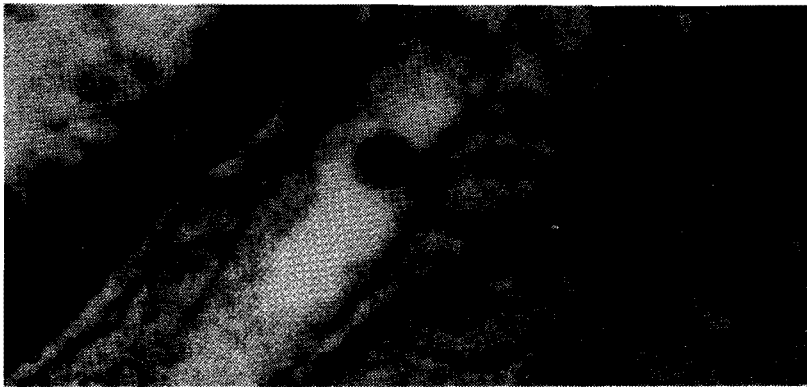


Fig. 8. Gemación de una partícula del virus de la EEV a nivel del sarcolema. Nótese el contacto con la membrana plasmática y en el extremo opuesto de la partícula la presencia de espículas. 106.250 X.

las 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 fibro-

blastos se vieron NC en el citoplasma y gemación de estas partículas precursoras en el membrana plasmática con formación de partículas virales (Fig. 16).

ch) **Endotelio y virus.** En todos los órganos examinados fué posible



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.

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 hablaran de lesiones endoteliales. Las membrana y las uniones intercelulares no mostraban alteraciones y contrastaba muchas veces la abundancia de partículas virales en la luz de los vasos y

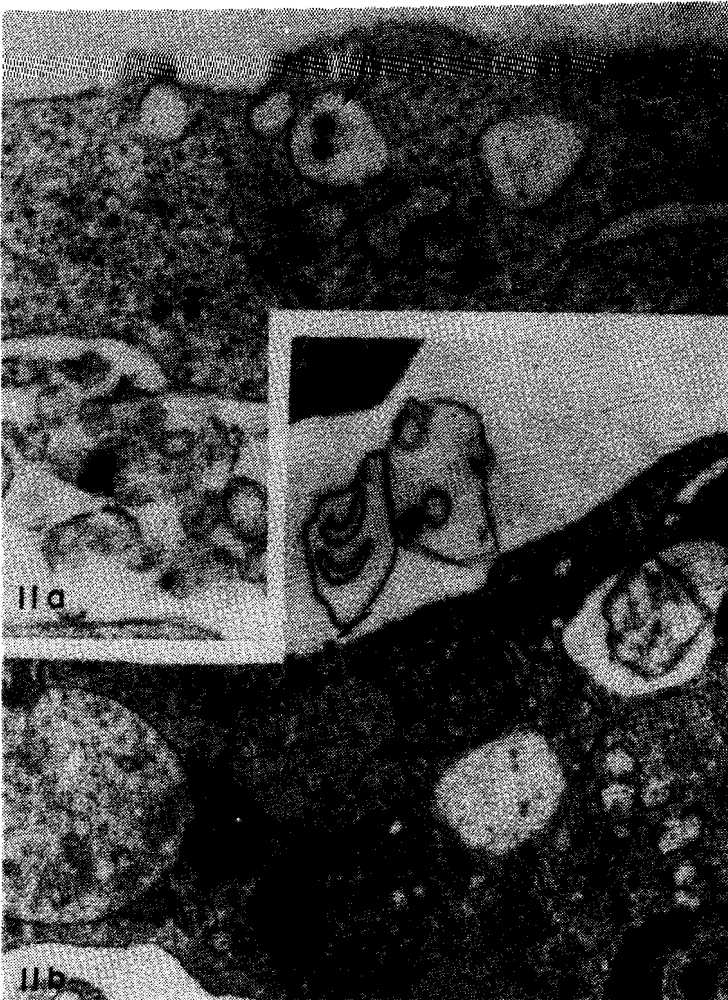


Fig. 11. a) Citoplasma de una célula de Kupffer en el hígado del ratón recién nacido inoculado intracerebralmente con el virus de la EEV. La flecha señala 2 partículas virales en una vacuola. 60.000 X. b) Partícula viral (flecha) en contacto con la membrana plasmática de una célula de Kupffer que muestra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

en 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 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

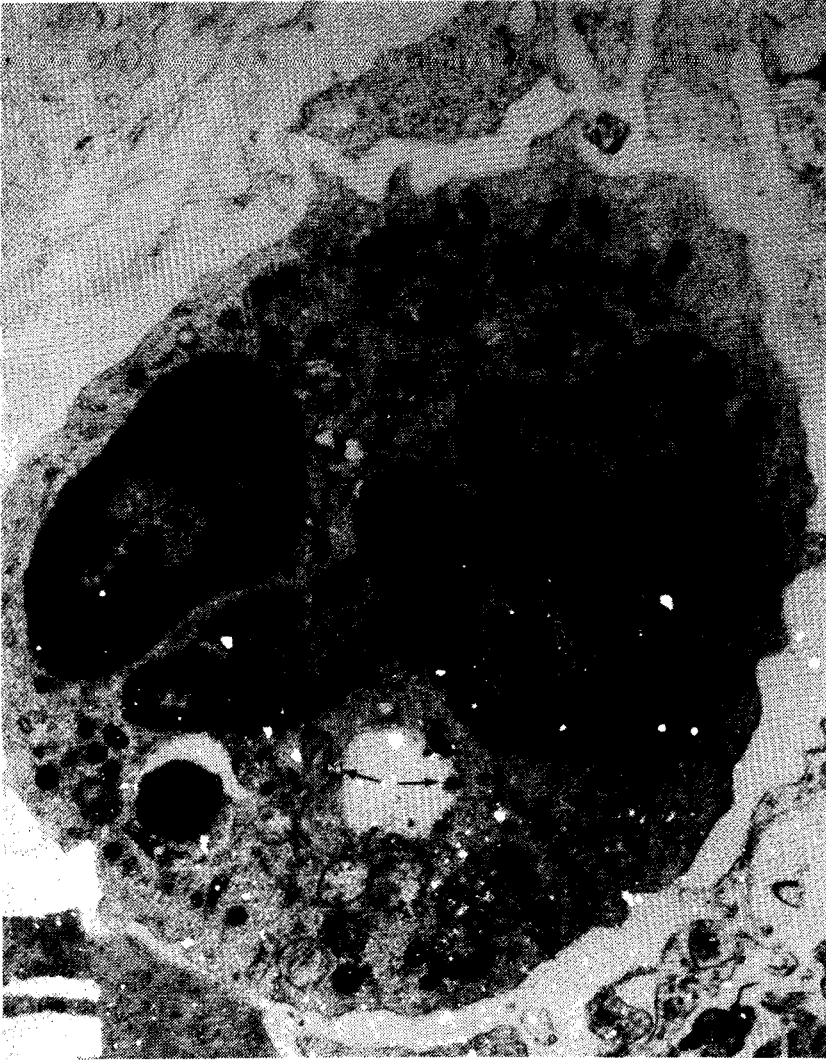


Fig. 12. Leucocito PMN neutrófilo con material de apariencia lipídica y membranas en fagolisosomas (cabezas de flechas), y un área de rarefacción citoplasmática, redonda, con algunas vesículas membranosas en su interior (flechas simples). 20.000 X.

previamente reportados por nosotros en el corazón(51).

d) **Desarrollo del virus de la EEV en el pulmón.** Las células epiteliales del alvéolo pulmonar mostraron escasas alteraciones. Algunos neumocitos granulares presen-

taban 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 neutro-



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.

citios membranosos no presentaban alteraciones ni evidencias de replicación viral (Fig. 18). Las células del epitelio bronquial y células claras no mostraron alteraciones a pesar de verse numerosas partículas virales

en el material electrodenso 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

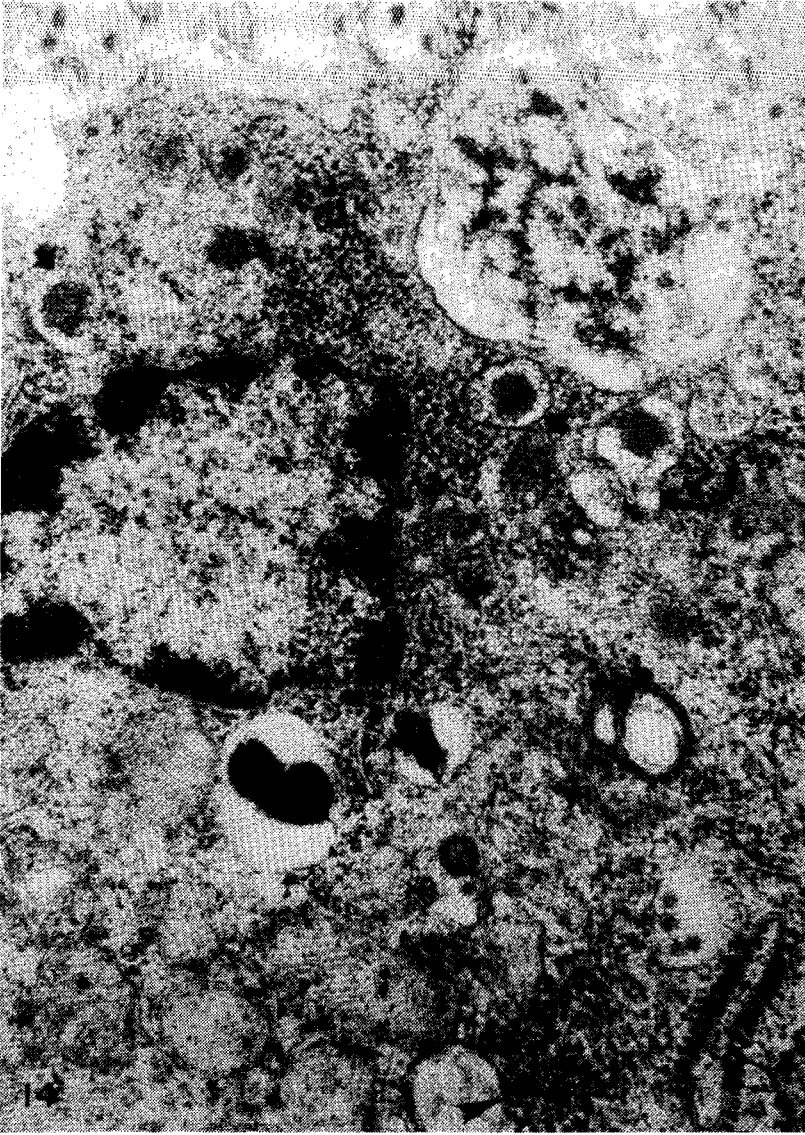


Fig. 14. Celula reticular del bazo en ratón recién nacido inoculado intracerebralmente con virus de EEV. Se ven signos evidentes de replicación viral en el extremo inferior de la fotografía; un área de viroplasma es señalado por una cabeza de flecha y numerosos nucleocápsidos están libres o adheridos 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.

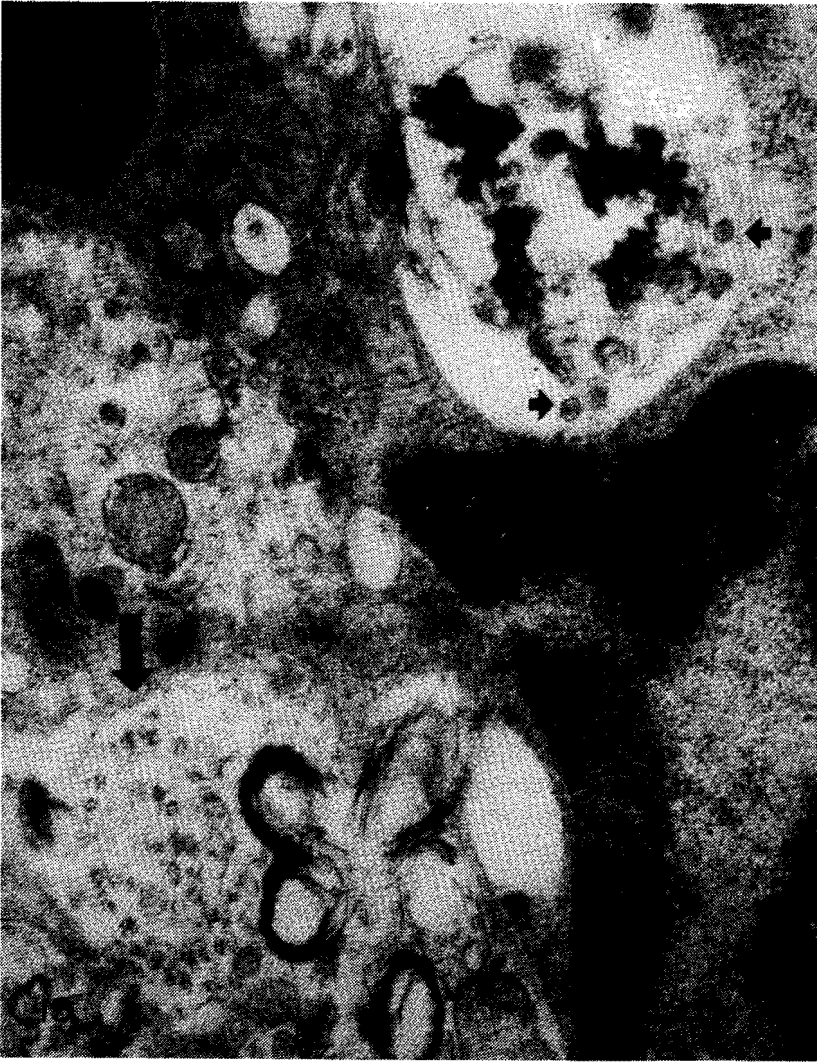


Fig. 15. Detalle de un macrófago con numerosos fagolisosomas en su citoplasma y con vacuolas que contienen membranas y material de apariencia necrótica (flechas cortas). Se ven vesículas del tipo CPV1 (flecha grande) y en la pared de las vacuolas se ven membranas redondeadas. 45.000 X.

fibroblastos o los macrófagos presentes en este espacio mostraban con frecuencia vacuolas en el citoplasma o dilatación de las cisternas del retículo endoplasmático. Entre

estas células y la fibras colágenas se vieron frecuentemente partículas virales. En algunos fibroblastos fué posible identificar partículas precursoras NC, y se vieron figuras de

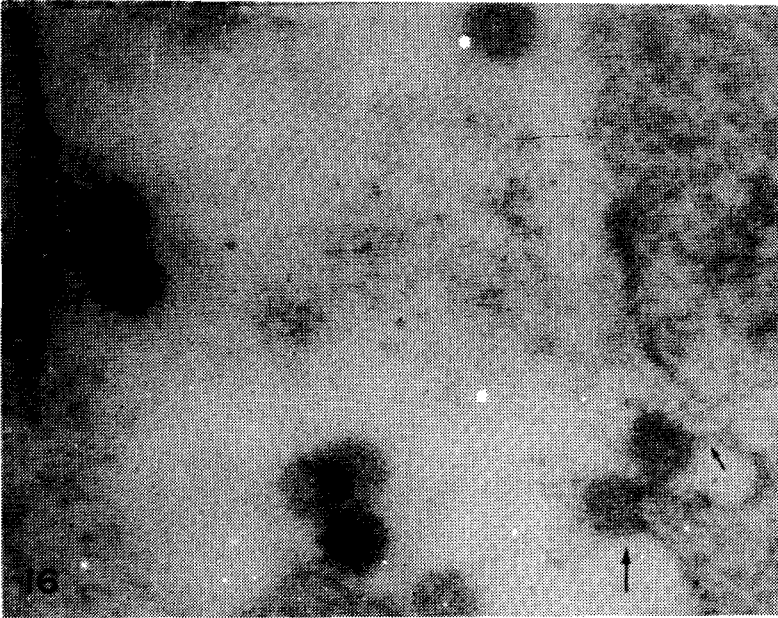


Fig. 16. Varias partículas del virus de la EEV en fase de gemación. Las flechas señalan uniones de las partículas con la membrana plasmática. 162.500 X.

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 en 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 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



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

coincidió con la actividad hemaglutinante. Estas fracciones fueron centrifugadas y el 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 pre-

sentaba 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 previamente 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

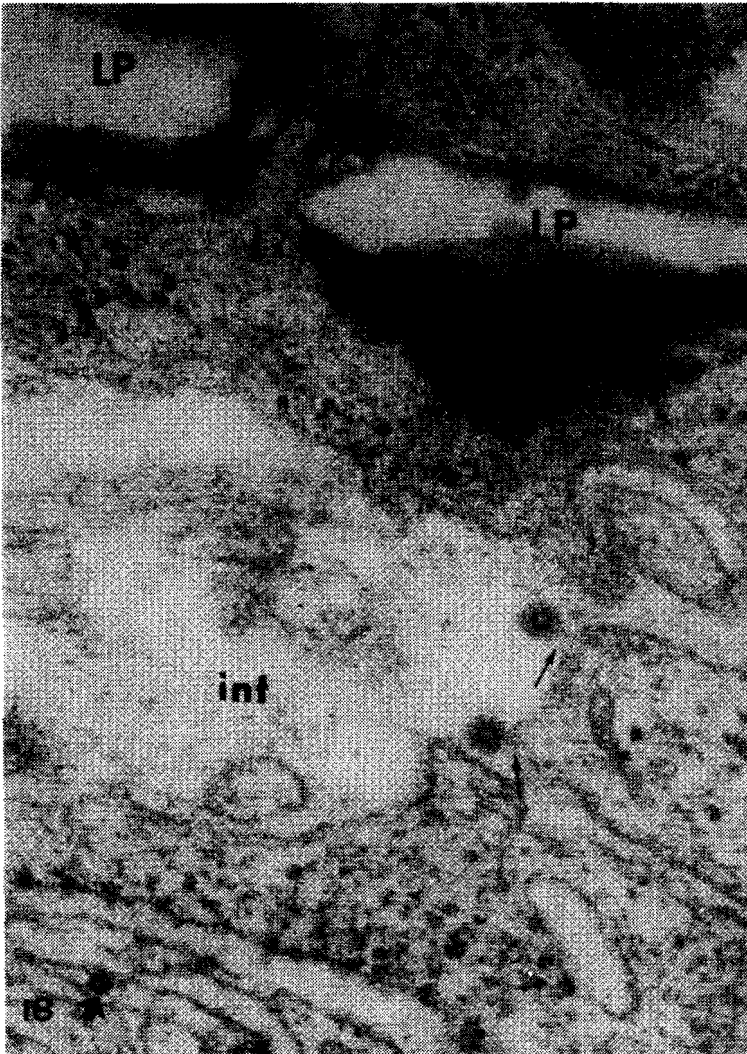


Fig. 18. Parte basal de un neumocito granular que muestra sus citosomas lipídicos (LP) y el núcleo. En el espacio intersticial del alveólo (int) se ven dos partículas virales naciendo por gemación (flechas simples). La flecha corta muestra un nucleocápsido en el citoplasma. 106.250 X.

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



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

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 más 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 median entre 10 y 12 nm. Estas estructuras ofrecen la apariencia de nucleocápsidos con simetría icosaédrica (Figs. 24a y 24b). Las subuni-

dades 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, 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 de partículas

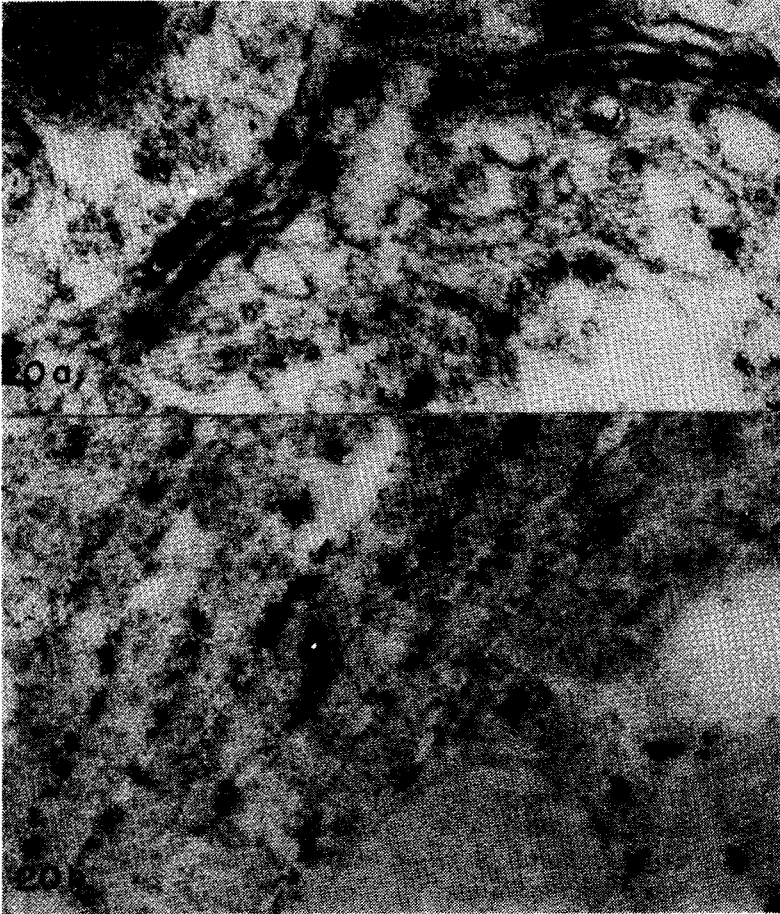


Fig. 20. Neurona de ratón inoculado intracerebralmente con el virus de la EEV. a) Actividad de fosfatasa ácida en las cisternas del aparato de Golgi. 162.500 X. b) Actividad de fosfatasa ácida en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso. El material ha sido contrastado únicamente con acetato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

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

Cuando la dilución es mayor se forman pequeños grupos en los cuales se pueden observar mejor el efecto de la tinción negativa con acetato de uranilo o con fosfotungstato.

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).

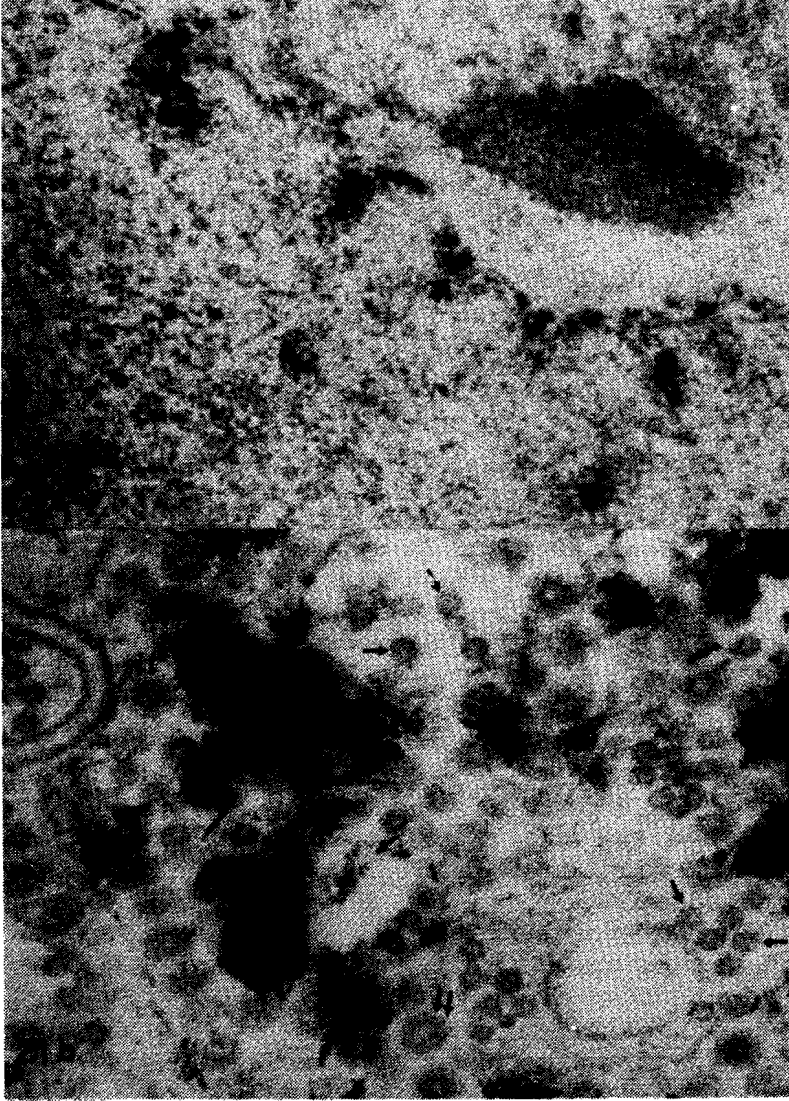


Fig. 21. Neurona de ratón inoculado intracerebralmente con el virus de la EEV. a) Actividad de fosfatasa ácida en la cisternas perinuclear (flecha gruesa). 60.000 X. b) Nucleocápsidos (flechas simples) y numerosas partículas virales (doble flecha) en vacuolas autofágicas que muestra actividad de fosfatasa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

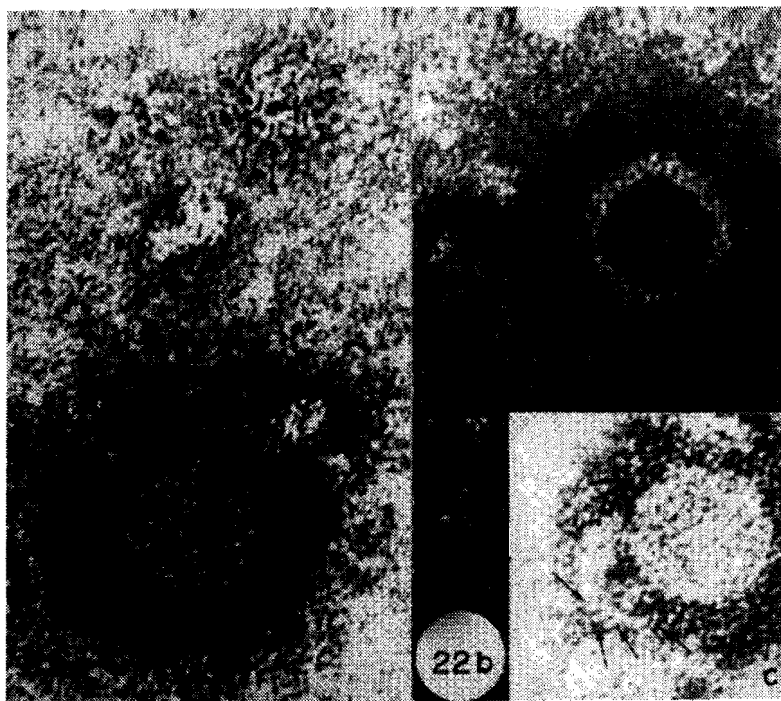


Fig. 22. a, b, c. Tinción negativa de partículas del virus de la EEV purificado en gradientes de 15 a 30% de sacarosa y centrifugados a 41.400 g. Las flechas señalan las subunidades que deben corresponder a las hemaglutininas, ubicadas en la superficie de los viriones o libres en forma de rosetas o de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

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 evidentemente como el bazo de las ratas usadas como control; los límites entre la pulpa roja y los folículos son pocos delimitados. Algunos folículos linfoides muestran moderada actividad fagocítica en los centros germinales. Hay un incremento de peque-

ños linfocitos alrededor de las arteriolas y a lo largo de las trabéculas; muchas de estas células aparecen con núcleos hiper cromáticos, 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 delimitados y la actividad en los centros germinales es marcada, con abundantes macrófagos y células del núcleo oval o indentado con nucleolo prominente y numerosos pequeños linfocitos del

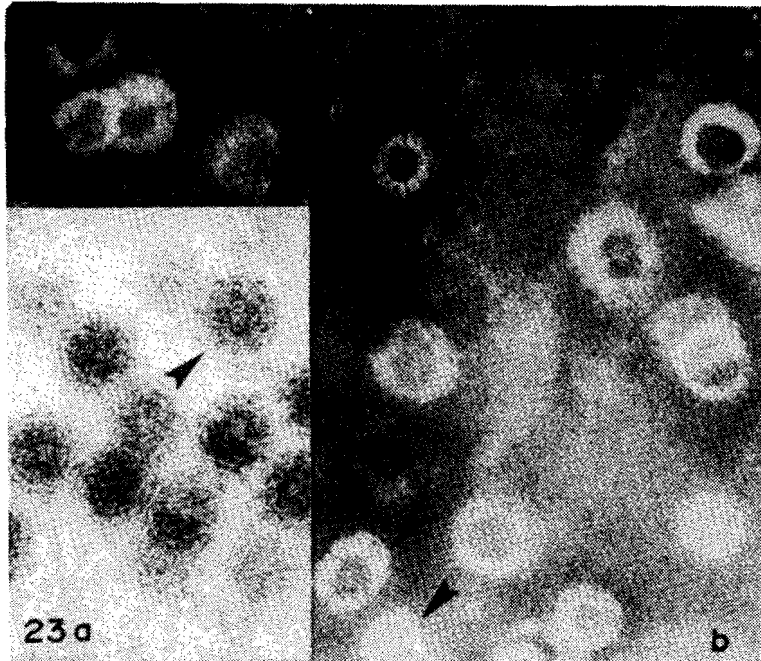


Fig. 23. a) En el recuadro del extremo inferior de la fotografía se ven partículas virales en cortes finos, algunas de ellas con apariencia globular de las espículas superficiales (cabezas de flechas) 250.000 X. b) Tinción negativa del virus de la EEV purificado en un gradiente de sacarosa de 15 a 30%. Las cabezas de flechas muestran las 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.

núcleo irregular. En la periferia del 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 del nucleolo prominente muestran signos de fagocitosis. Se ven mitosis típicas. En dos casos se vieron células multinucleadas con aspecto de histocitos y evidencia de fagocitosis. La población de linfocitos alrededor

de los vasos y de las trabéculas es menos evidente (Figs. 27a y 27b).

8° día post inoculación. Los folículos linfoides son muy prominentes, algunos miden el doble del tamaño normal, otros se hacen confluentes con doble corona alrededor del centro germinal muy activo, la más interna de pequeños linfocitos y la más periférica formada por plasmocitos, plasmoblastos, células reticulares y mononucleares de núcleo bien teñido. En el centro germinal la población linfocitaria es mix-

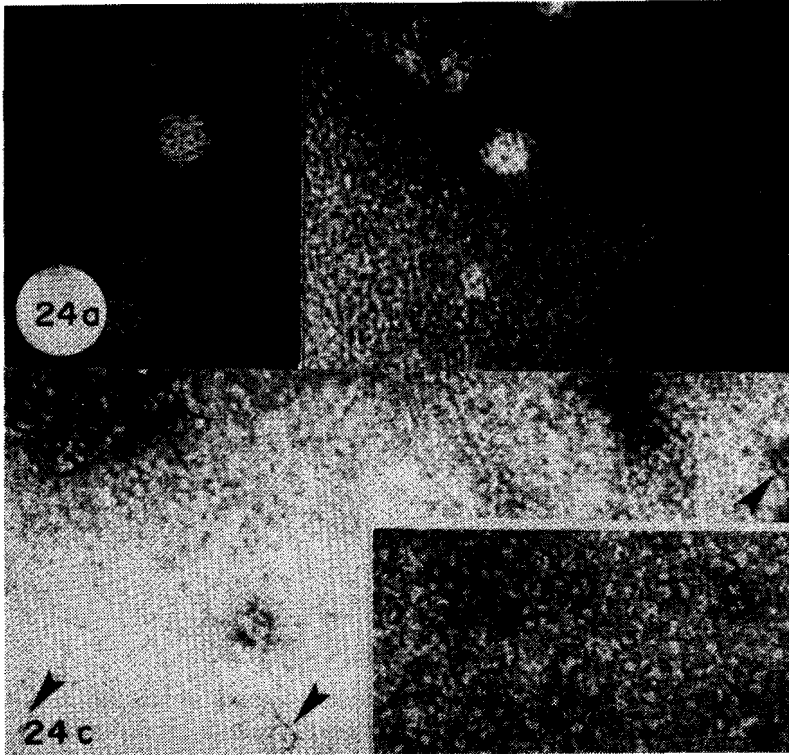


Fig. 24. a y b) Nucleocápsidos del virus de la EEV aislados por purificación y tratamiento del virus con DOC. A pesar de la existencia de "ruido de fondo", se observan las subunidades capsoméricas en los nucleocápsidos que miden 25 a 32 nm de diámetro. 406.250 X. c y d) Tinción negativa de fracción hemaglutinante 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 cultivos de células malignas(112). 406.250 X.

ta, 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).

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 algunos de ellos, vecinos a la superficie de corteza cerebral, se ven células mononucleares

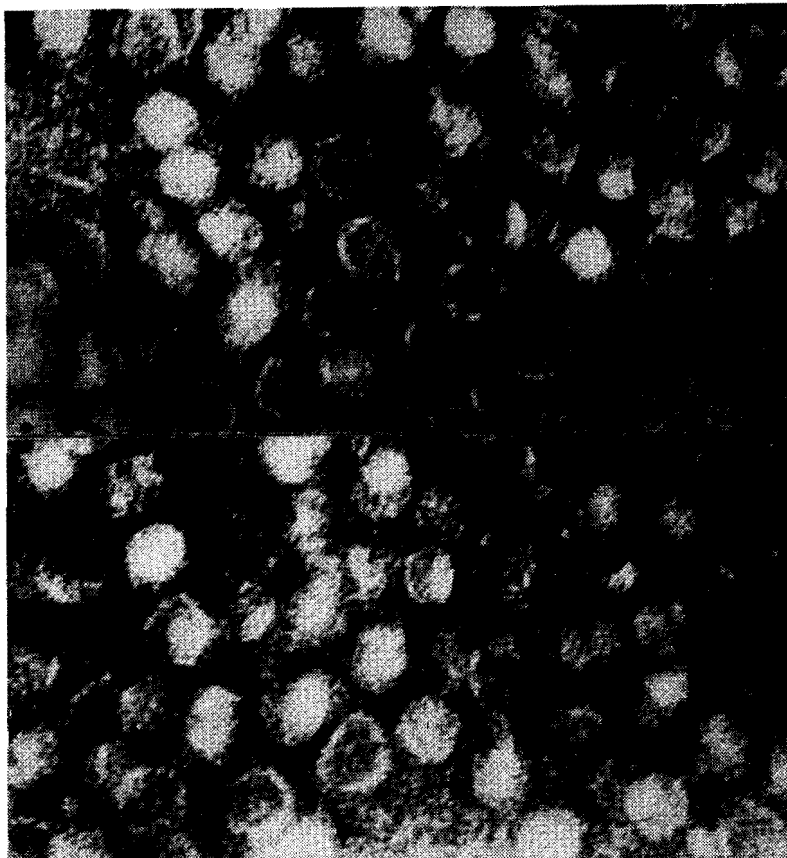


Fig. 25. a y b) Partículas virales en presencia de suero con anticuerpos anti-EEV, demostrando aglutinación de los viriones; algunas de las partículas virales se ven unidas por puentes en forma de banda o de Y (cabeza de flechas) 162.500 X.

y algunos leucocitos PMN. En alguna áreas, el infiltrado meníngeo 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 sustancia gris cortical. Hay áreas focales en la corteza que muestran necrosis isquémica aguda de las neuronas, con moderado edema intersticial y en unas 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 áreas de la corteza cerebral con edema severo y espongirosis. En estos

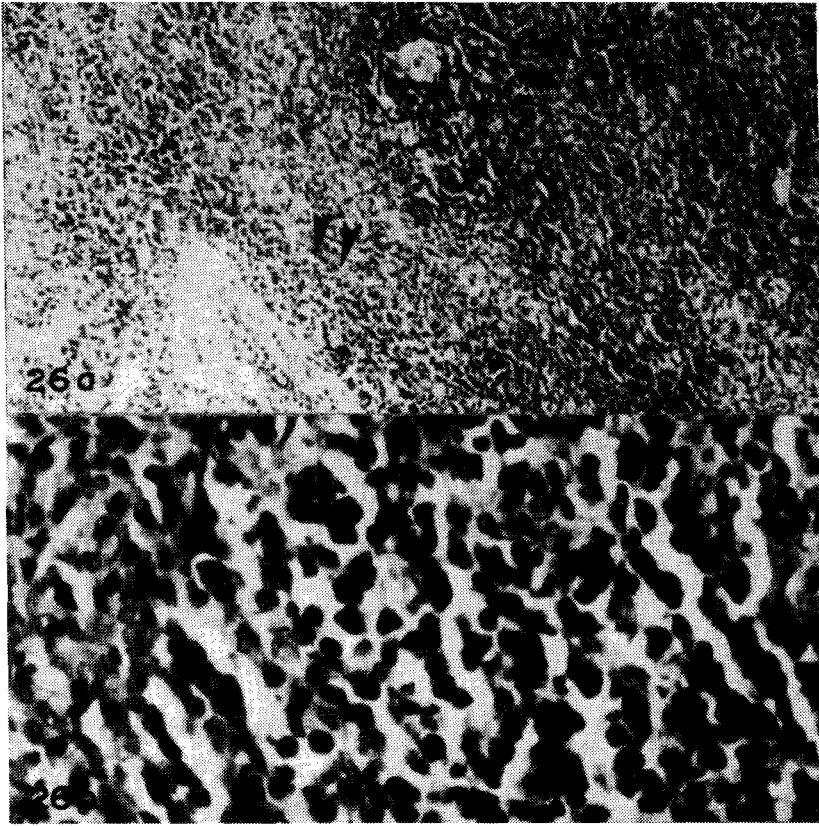


Fig. 26. Bazo de rata inoculada 4 días antes por vía ip con 200 ufp de virus de la EEV, cepa Guajira. a) Se ve aumento de la población linfocitaria perivascular y peritrabecular (cabeza de flecha). 100 X. b) Se observa un área de incremento celular periarterial con células mononucleares hiper cromáticas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

focos la necrosis isquémica de la neuronas es muy severa y ya hay áreas donde 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 leuco-

цитos 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 zona de mesencéfalo. En los reblandecimientos corticales se ven numerosas células granulo adiposas con intensa actividad fagocítica. Se ven manguitos perivasculares con

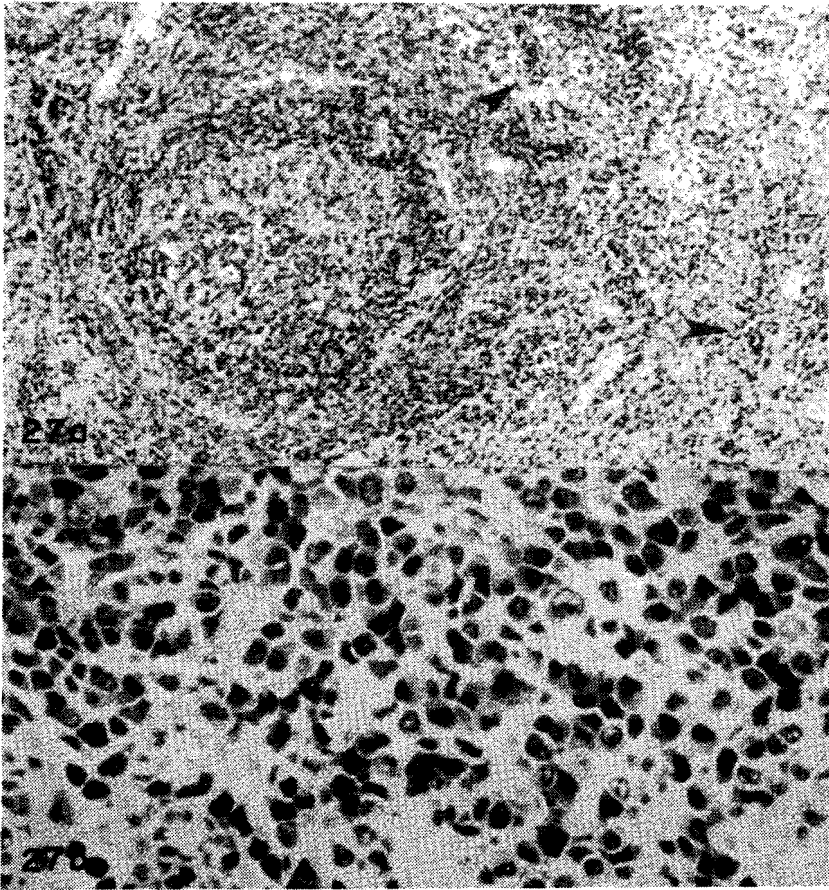


Fig. 27. Bazo de rata inoculada 6 días antes por vía ip con 200 ufp del virus de la EEV, cepa Guajira. a) Se observa un folículo linfático con marcada actividad fagocítica en el centro germinal y aumento de la celularidad en la periferia. Se ven grupos de pequeños linfocitos periarteriales en la pulpa 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.

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 mas evidentes en la vecindad de las áreas de mayor edema. La pérdida de las neuronas en grandes sectores de la corteza cerebral es evidente (Figs. 31a, 31b, 31c).

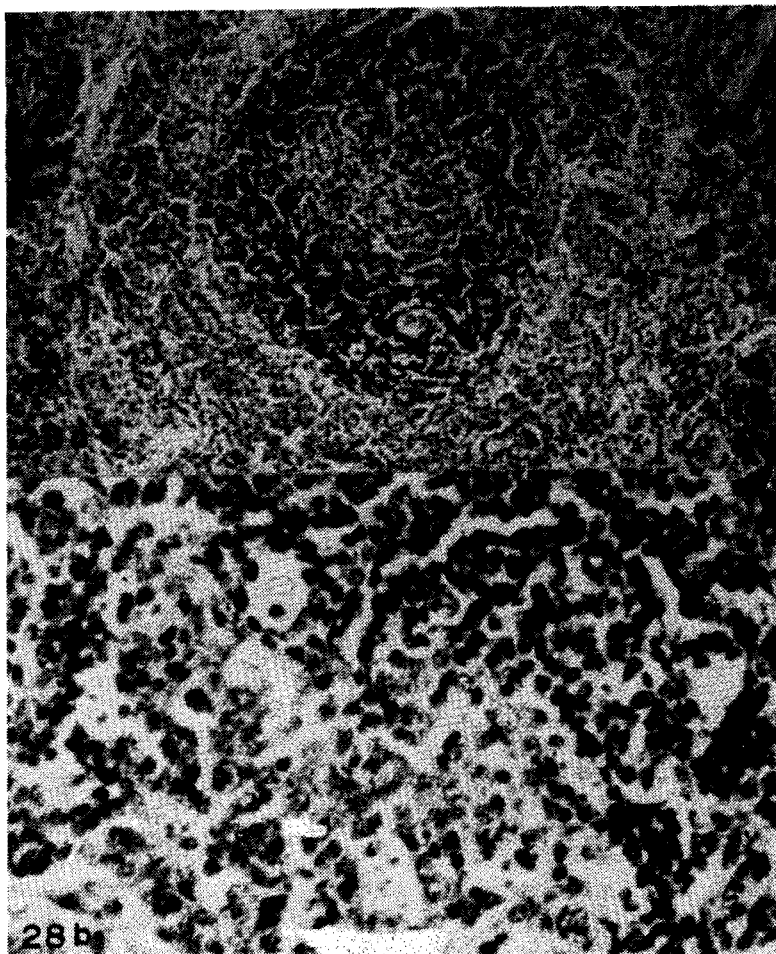


Fig. 28. Bazo de rata 8 días después de la inoculación ip con virus de la EEV, cepa Guajira. a) Se observa un collar de pequeños linfocitos rodeando en centro germinal del folículo que muestra actividad fagocítica; en la periferia se ve incremento de células reticulares, plasmocitos y células linfomonocíticas.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

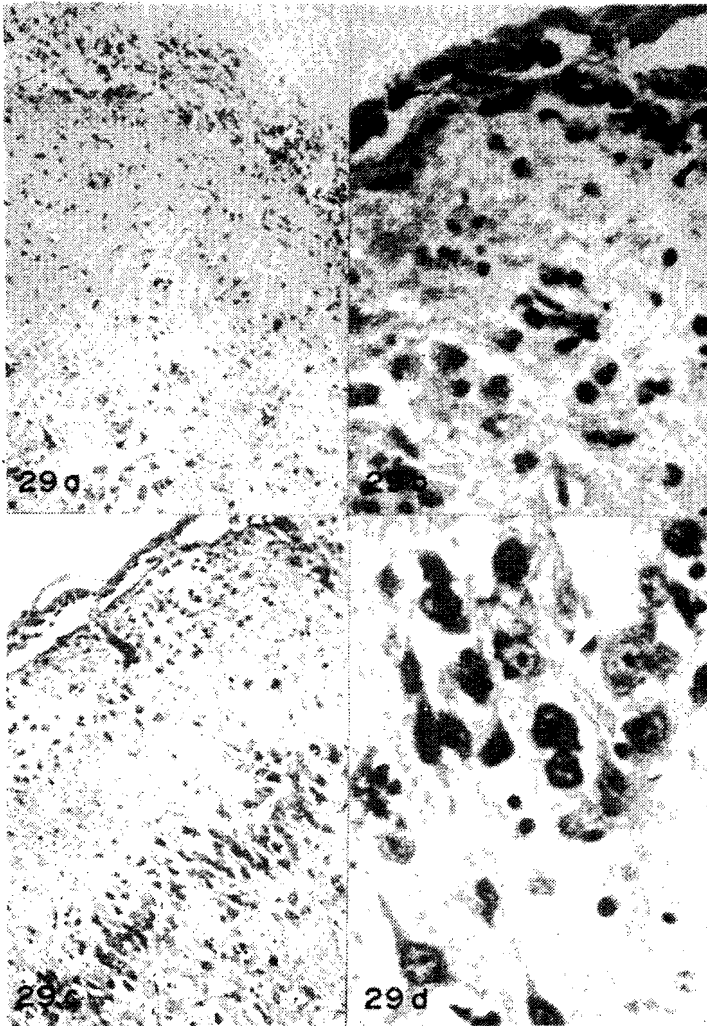


Fig. 29. SNC de rata 4 días post inoculación ip con virus de la EEV. a) Se observa infiltración meníngea con células mononucleares que se extiende a los espacios de Virchow-Robin y a la sustancia gris cortical. 100 X. La figura b, a mayor aumento, demuestra las células mononucleares y PMN en la capa 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.

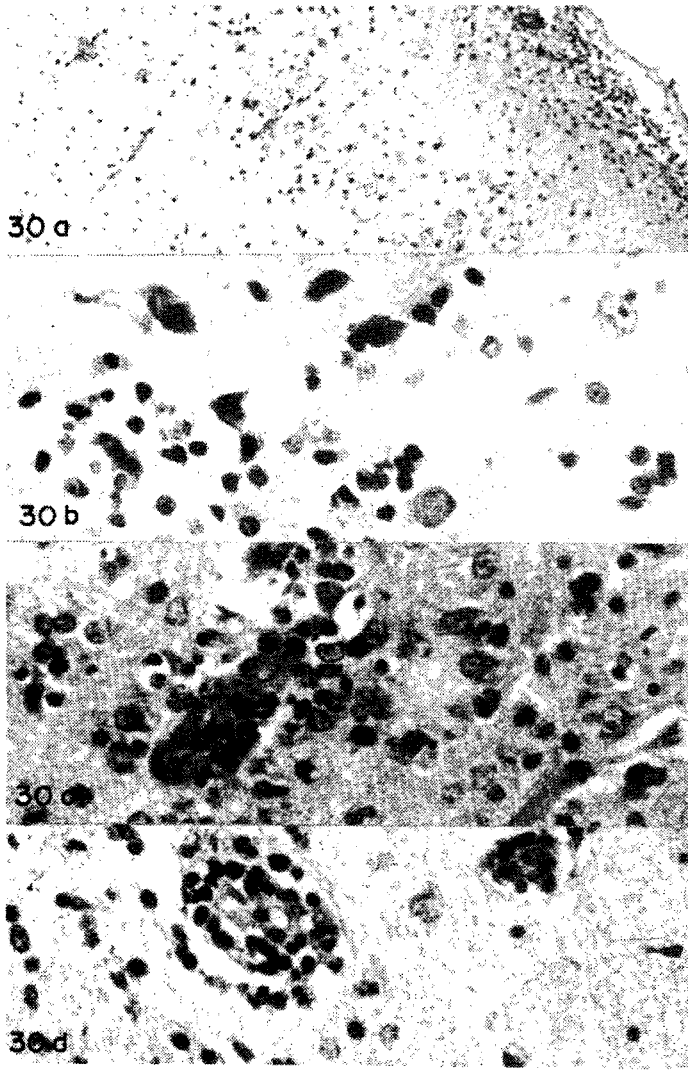


Fig. 30. SNC de rata 6 días después de la inoculación ip con el virus de la EEV. En la figura a, se observa un foco espongiótico en la corteza con pérdida de neuronas e intensa microgliosis que se extiende desde la superficie de las meninges y la capa molecular muy infiltradas por células mononucleares. 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 perivasculares con severo edema y astrogliosis reactiva. 400 X.

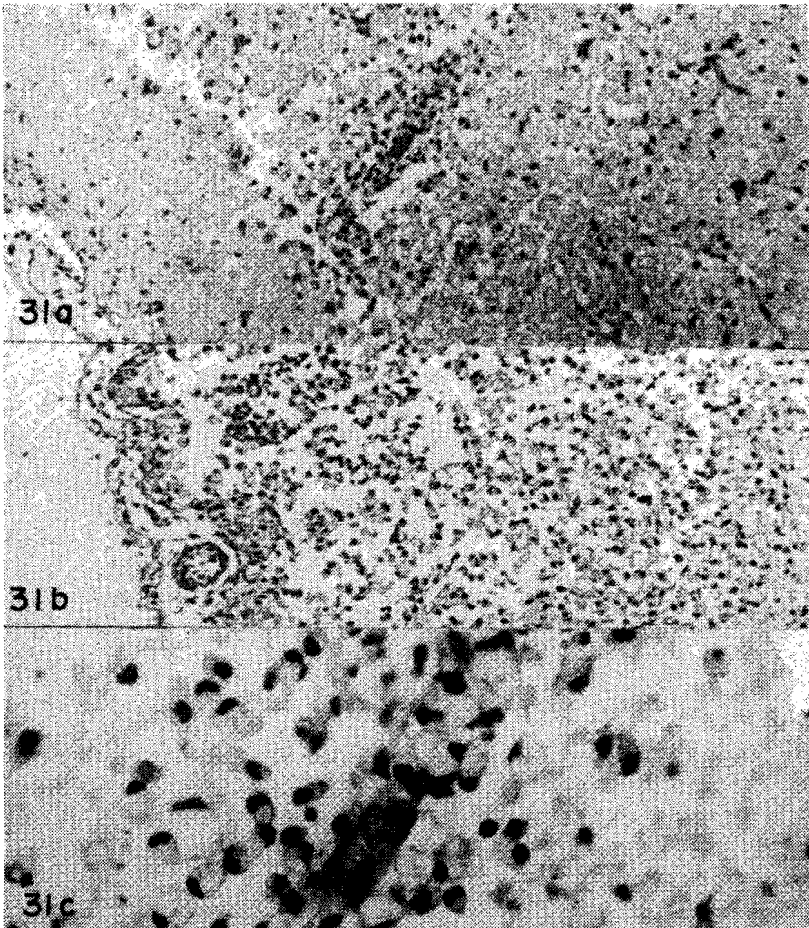


Fig. 31. Áreas de reblandecimiento cerebral en las ratas 8 días después de la inoculación ip con 200 ufp del virus de la EEV. En las figuras a y b, se ven células granulo adiposas y reacción astrogliar periférica. 100 X. La figura c, es un mayor aumento de la figura a, que señala la intensidad actividad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

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 granulo adiposas infiltrando la zona y alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 32a). Se ven también infiltrados perivascular con células mononucleares en las me-



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 astrogliar intensa y microgliosis. 400 X. b) Area marginal de un reblandecimiento antiguo (3 meses) en la cual se ven macrofagos y otras células mononucleares de estirpe microglial y astrogliosis reactiva periférica. 400 X.

ninges, a nivel del hipocampo, corteza cerebral y mesencéfalo. En las 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 bastoncillos 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

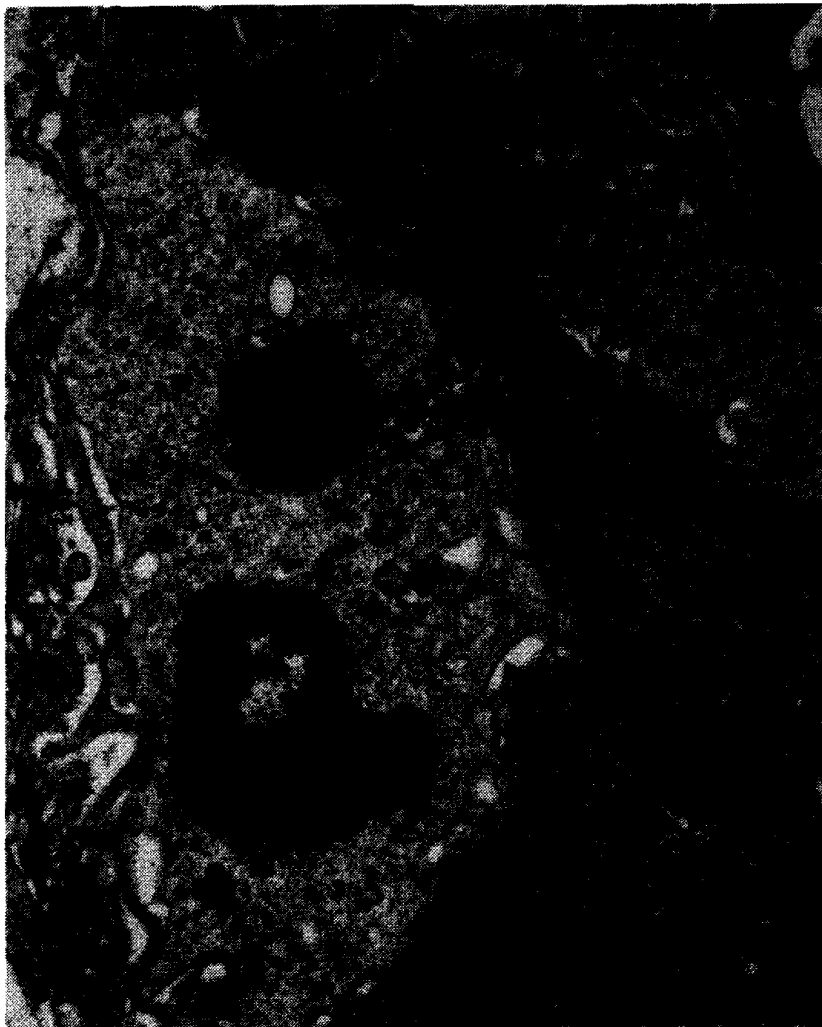


Fig. 33. Infiltrado inflamatorio en el neuropilo 3 meses después de la infección aguda con el virus de la EEV. Se observa parte del citoplasma de un macrófago mononuclear (M), y de un plasmocito con abundante retículo endoplasmático rugoso (P). 15.000 X.

después de la infección. La respuesta microglial era muy evidente en áreas focales de la corteza cerebral y en general adoptó una organización difusa predominante en las zonas grises corticales y del mesencé-

falo. Se vieron focos de degeneración espongiiformes en la corteza cerebral y en áreas pequeñas de la sustancia blanca con presencia de células mononucleares y microgliosis reactiva.

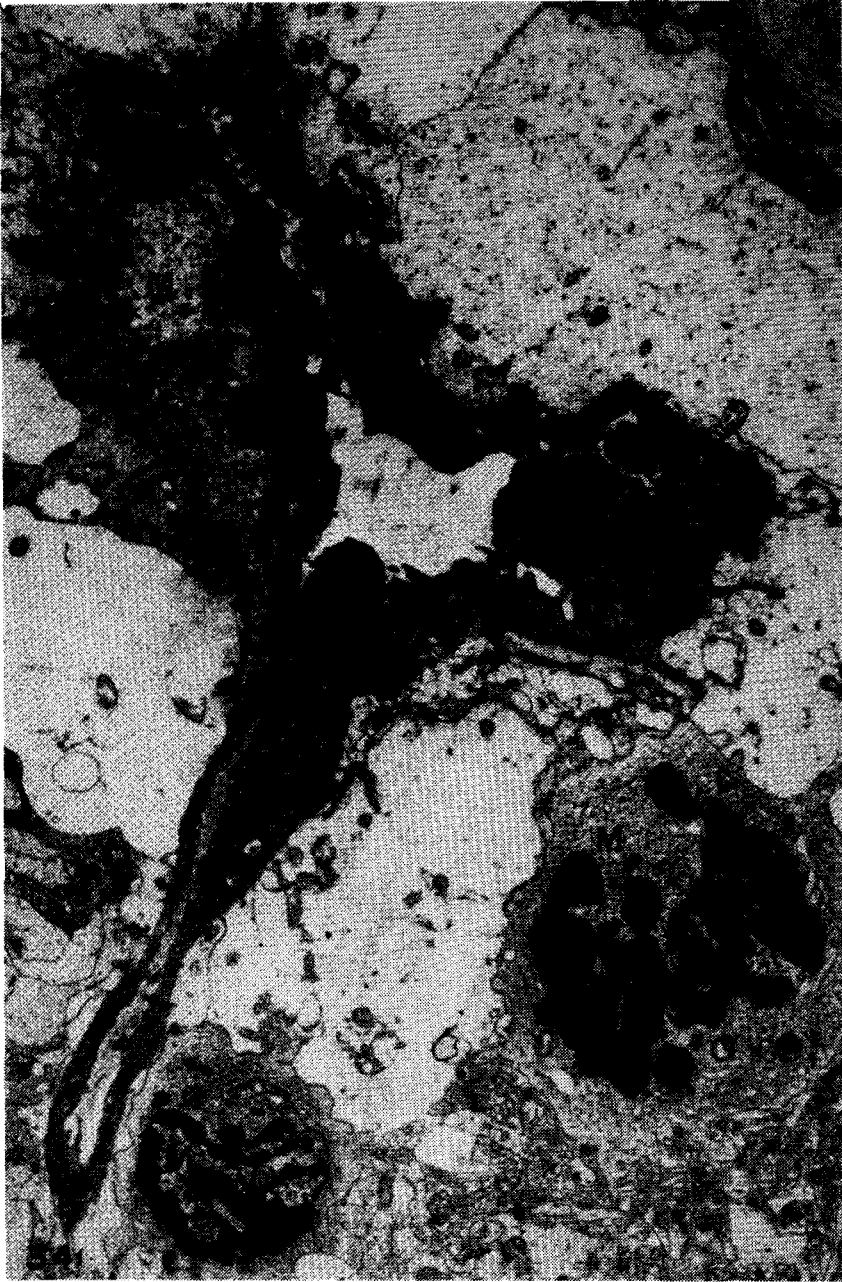


Fig. 34. Vaso sanguíneo en la corteza cerebral. Alrededor del vaso se ven pericitos mononucleares similares en las características de su citoplasma (con lisosomas y prolongaciones pseudopódicas) a las células que se ven infiltrando el neuropilo. Alrededor del vaso se observa dilatación de los procesos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

b) Examen con el microscopio electrónico. El hallazgo más característico fue la presencia en el neuropilo y alrededor de las neuronas de 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 macrófágicas o amiboideas parecían migrar desde la peri-

feria 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.

Se vieron alteraciones en los axones, caracterizadas por ensan-

chamiento 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.

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 *Toxoplasma 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

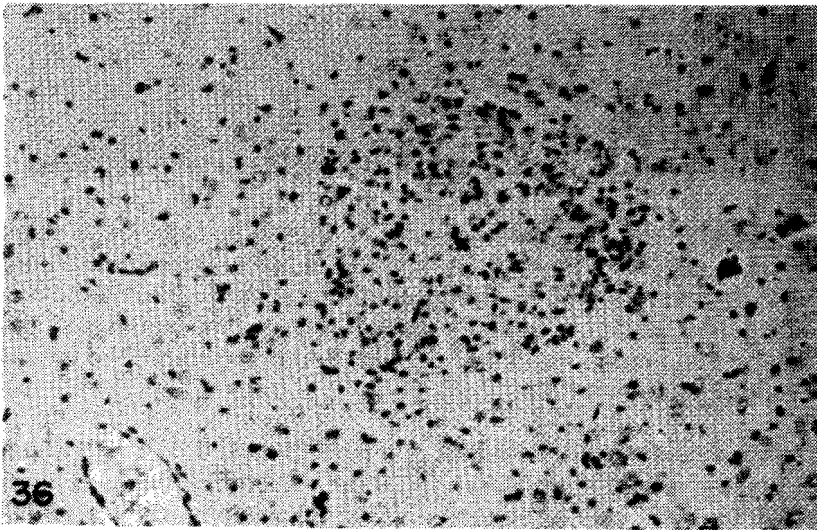


Fig. 36. Lesión granulomatosa en la corteza cerebral de una rata control. Se observan escasas células mononucleares y con reacción microglial. Alrededor de un vaso se vé discreto infiltrado con células mononucleares. 25 X.

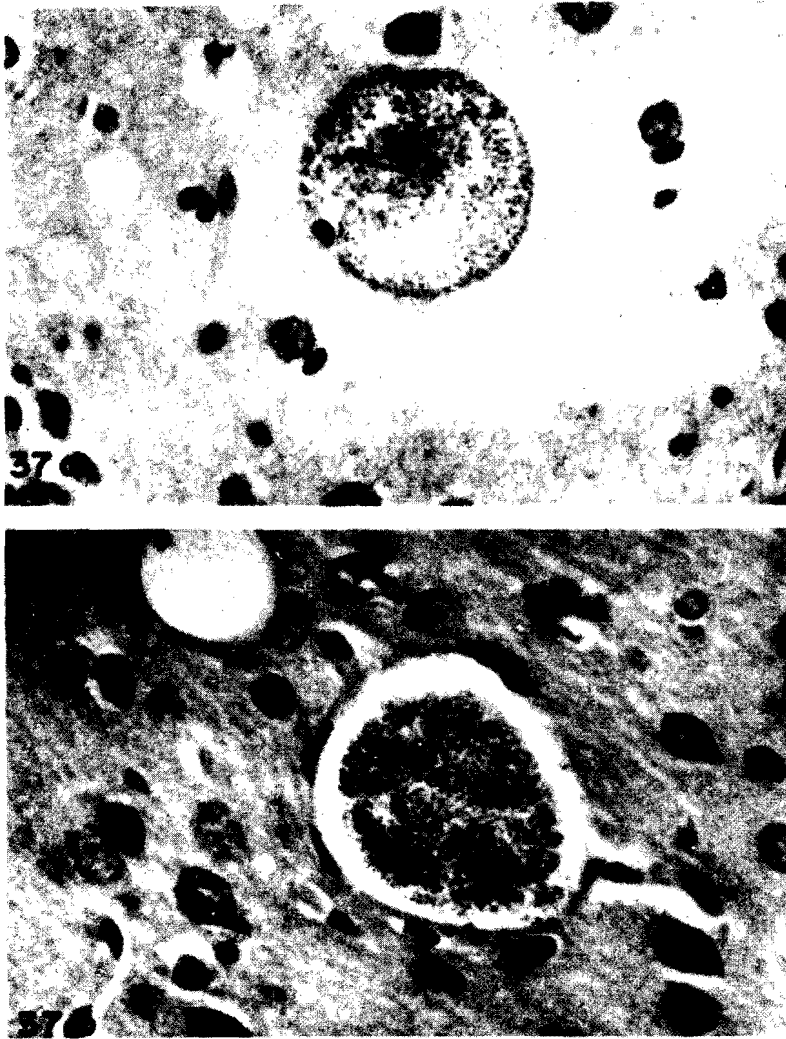


Fig. 37. Cuarto día post inoculación con el virus de la EEV. a) Quiste con abundantes toxoplasmas en la corteza cerebral de una rata control. 400 X. b) Se observa un quiste con un espacio lúcido entre los parásitos y su pared. 400 X.

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 el octavo día murieron durante la noche 2 ratas de 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