

Desarrollo del virus de la Encefalitis equina Venezolana en el tejido nervioso de ratones recién nacidos. Ultraestructura e histoquímica.

Jorge García-Tamayo.

Laboratorio de Microscopía Electrónica, Servicio de Patología, Hospital General del Sur, Maracaibo, Venezuela.

Resumen. Se estudió la estructura del tejido nervioso de ratones recién nacidos inoculados con el virus de la EEV. Las células gliales mostraron hinchamiento y aumento del glucógeno; las neuronas presentaron alteraciones en la estructura de las mitocondrias y en la organización de los ribosomas; el complejo de Golgi presentó gran desarrollo y tortuosidad de sus cisternas. La actividad de fosfatasa ácida en la cisterna perinuclear y en el retículoendoplasmático granular, sugiere un aumento de producción de esta enzima en las neuronas invadidas por el virus de la EEV. Se estudió la localización de las partículas virales en relación con la viremia y diseminación de la infección, destacándose la presencia de partículas virales en la luz de los vasos sanguíneos y alrededor de las vainas de mielina de algunos axones. El desarrollo de las partículas virales se comparó con las observaciones hechas en otras arbovirosis, proponiéndose que los precursores virales se originen en masas de viroplasma, desde donde migran a través del citoplasma, hacia las cisternas y vacuolas del complejo de Golgi o hacia la membrana plasmática, transformándose en partículas virales maduras por gemación.

Ultrastructural and histochemical study on the development of Venezuelan equine encephalitis virus in the central nervous system of newborn mice

Invest Clin 37: 7-63, 1971

Summary. The ultrastructure of the CNS of newborn mice inoculated with VEE virus was studied. Glial cells revealed swelling and abundant glycogen in their cytoplasm; structural alterations in mitochondria and ribosomes are described; increased number of tortuous cisterns in the Golgi complex was also demonstrated. Acid phosphatase activity was found to be increased in the cisterns and vacuoles of the Golgi complex and in the

lysosomes. Acid phosphatase activity in the rough endoplasmic reticulum and in the perinuclear cistern of some neurons appears to indicate that there is an increased production of the enzyme by the infected cells. The relationship of viral particles to viremia and infection routes was discussed, and the presence of virus in the blood vessels as well as around the myelin sheath of axons was considered important. The mode of development of VEE viral particles was investigated. Precursor particles appear to be found in masses of viroplasm, migrating to the membrane of the Golgi cisterns and vacuoles or to the plasma membrane and being transformed into mature viral particles by budding.

INTRODUCCION

La encefalitis equina venezolana (EEV) fue reportada por primera vez por Kubes en el año 1936, considerándola, en una publicación del Ministerio de Agricultura y Cría, como una peculiar epizootia de equinos, la cual él denominó, "la peste loca de las bestias", describiendo sus manifestaciones clínicas y haciendo indicaciones sobre su tratamiento y prevención.

En 1938 se observó en Venezuela la primera epizootia equina de importancia, y ese año, Kubes y Rios (41) aislaron el virus de la EEV. La primera sospecha de que la EEV podía afectar a los seres humanos fue reportada por Gilyard (26), a raíz de una epizootia de EEV en Trinidad, el año 1945. En 1952 se produjo una grave epidemia de EEV en El Espinal (Colombia), demostrándose la importancia de controlar epidemiológicamente la EEV, para evitar brotes que afectan a los seres humanos (63). Casos de encefalitis epidémica fueron denunciados en Maracaibo y sus alrededores por Negrette en el año 1959, y reportados en 1960 (54), describiéndose las manifestaciones clínicas y hematológicas

de los pacientes afectados. En 1962 cuando se produjo un brote epidémico grave en la parte norte del Estado Zulia, precedido de una severa epizootia en equinos, se tuvo claro conocimiento de la magnitud del problema que representa la EEV en nuestra región (4, 9).

En la actualidad se conocen con bastante precisión los aspectos epidemiológicos de la EEV en la Guajira y otras áreas del Estado Zulia; en los años 1968 y 1969, se han producido epizootias en equinos y brotes epidémicos de EEV, aumentando los conocimientos sobre la clínica, la serología y la influencia de los factores ambientales, tanto climatológicos como socioeconómicos, en la aparición y el desarrollo de las epidemias de la EEV. Sin embargo, desde el punto de vista morfológico y particularmente ultraestructural, los estudios sobre la EEV, son muy escasos. Se han reportado, en publicaciones previas, estudios con el microscopio electrónico sobre las alteraciones de células cultivadas infectadas con el virus de la EEV (8, 52), y sobre las modificaciones inducidas por el virus de la EEV y por los Reovirus en células cultivadas (57). Mussgay y Weibel demostraron, por

medio de la coloración negativa y el sombreado, las características ultraestructurales del virus de la EEV (53). Sin embargo, no se han reportado estudios con el microscopio electrónico sobre la estructura de tejidos animales o humanos infectados con el virus de la EEV.

En este trabajo, presentamos las alteraciones ultraestructurales del sistema nervioso de ratones recién nacidos, inoculados intracerebralmente con una suspensión de la cepa Guajira del virus de la EEV. Demostraremos la presencia de las partículas virales y trataremos de exponer una secuencia que explique la manera como se desarrolla el virus y cuáles son sus efectos en las células del sistema nervioso. Igualmente, estudiaremos la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el tejido nervioso de los ratones inoculados, discutiendo los resultados histoquímicos a nivel ultraestructural y la relación entre estos y las alteraciones submicroscópicas y funcionales inducidas en las células nerviosas por el virus de la EEV.

MATERIAL Y METODO

Se estudió el tejido nervioso de 16 ratones recién nacidos, doce de los cuales fueron inoculados intracerebralmente con una suspensión de virus de la EEV de la cepa Guajira, y los 4 restantes fueron utilizados como control. Los ratones y los virus de la EEV, fueron facilitados por el Dr. G. Bergold del Departamento de Virología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Se inocularon 0,02 cc. de una dilución 10^{-9} .

Los ratones fueron sacrificados por decapitación, algunos 16 y 24 horas después de la inoculación y otros entre 30 y 48 horas, cuando los signos de infección eran evidentes. Se tomaron muestras de cerebro y cerebelo las cuales se fijaron en glutaraldehído al 3 % en solución reguladora de fosfato de sodio a pH 7,2 y a 4°C. En algunos ratones se practicaron estudios de histoquímica aplicada al microscopio electrónico, procediéndose a fijar el material en glutaraldehído al 6,25% en solución reguladora de cacodilato, 0,067M a pH 7,2 y a 4°C, durante 3 a 4 horas; el procedimiento utilizado en la preparación de este material se describirá posteriormente.

Las muestras fijadas en glutaraldehído al 3% fueron seccionadas en pequeños trozos menores de un milímetro de diámetro y se lavaron en solución reguladora de fosfato de sodio a pH 7,2 y a 4°C, durante 24 horas. Se fijó el material con tetraóxido de osmio al 2% durante tres horas, se deshidrató en acetona a concentraciones crecientes y se incluyó en Araldita polimerizándose en estufa a 60°C durante 48 horas. Los bloques obtenidos se cortaron en un ultramicrotomo Porter Blum MT-2 utilizando un cuchillo de diamante, y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. El material se examinó en un microscopio electrónico JEM 7A, utilizando una aceleración de voltaje de 80 Kv.

Para el estudio histoquímico se utilizó el método de Gomori para fosfatasa ácida (5) con algunas modificaciones, adoptadas de acuerdo con los procedimientos técnicos empleados en el Departamento de Microbiología

del IVC. El material fijado durante 3 a 4 horas en glutaraldehído, fue lavado en solución reguladora de cacodilato 0,1M a 4°C que contenía 7,5 gramos de sacarosa, y seccionado en un criostato, haciéndose cortes por congelación de 50 micras de espesor. Los cortes fueron flotados en solución cacodilato a 4°C y se incubaron en un medio de Gomori para fosfatasa ácida a 37°C durante 90 minutos. El medio de Gomori se preparó utilizando beta glicerofosfato de sodio al 2%, buffer acetato 0,1M con pH 5,2 y acetato de plomo; cuando se evidenció precipitado se filtró el medio antes de proceder a la incubación.

Algunas muestras se incubaron en un medio de Gomori, idéntico al descrito, pero sin el substrato beta glicerofosfato y este material se utilizó para controlar la reacción histoquímica. Las muestras incubadas fueron lavadas en buffer acetato 0,1M a pH 5,2 durante 1 minuto y posteriormente se trataron brevemente con ácido acético al 2% para pasar de nuevo a la solución reguladora de acetato de pH 5,2. Las muestras se fijaron en tetraóxido de osmio y se deshidrataron e incluyeron de acuerdo con el procedimiento descrito previamente.

RESULTADOS

El estudio del material de los ratones inoculados, reveló variaciones importantes dependiendo del tiempo transcurrido entre la inoculación y la muerte de los animales. En los ratones sacrificados 16 horas después de la inoculación, se obser-

varon escasas modificaciones del tejido nervioso; algunas neuronas mostraban hipertrofia del complejo de Golgi, notándose en ocasiones masas pequeñas y mal limitadas formadas por material granular en el citoplasma de células nerviosas sin mayores alteraciones (Fig. 9). Los astrocitos presentaban hinchamiento discreto de los procesos pedales, particularmente notorio alrededor de los vasos sanguíneos. En uno de los cortes se observaron dos partículas redondeadas, de 45 milimicras de diámetro, con un centro más denso de 35 milimicras, ubicadas en la luz de un vaso sanguíneo.

En el material de los ratones sacrificados 24 horas o de 30 a 48 horas después de la inoculación, las alteraciones del tejido nervioso fueron más conspicuas. Las células gliales, en general se mostraron hinchadas y en ocasiones se observó un aumento de las partículas de glicógeno beta en el citoplasma de los astrocitos en forma dispersa o en grupo, rodeadas por una membrana.

Las células nerviosas de los ratones inoculados mostraron dilatación de la cisterna del retículo endoplasmático en la primera etapa de la infección (Fig. 5), notándose cómo posteriormente los ribosomas disminuían en número y los polirribosomas se disgregaban, dándole a la célula una apariencia vacía (Fig. 14). Algunos ribosomas se organizaban con disposición helicoidal.

El aparato de Golgi sufrió cambios notables desde las primeras etapas de la infección. En las muestras de 16 a 24 horas después de la inoculación,

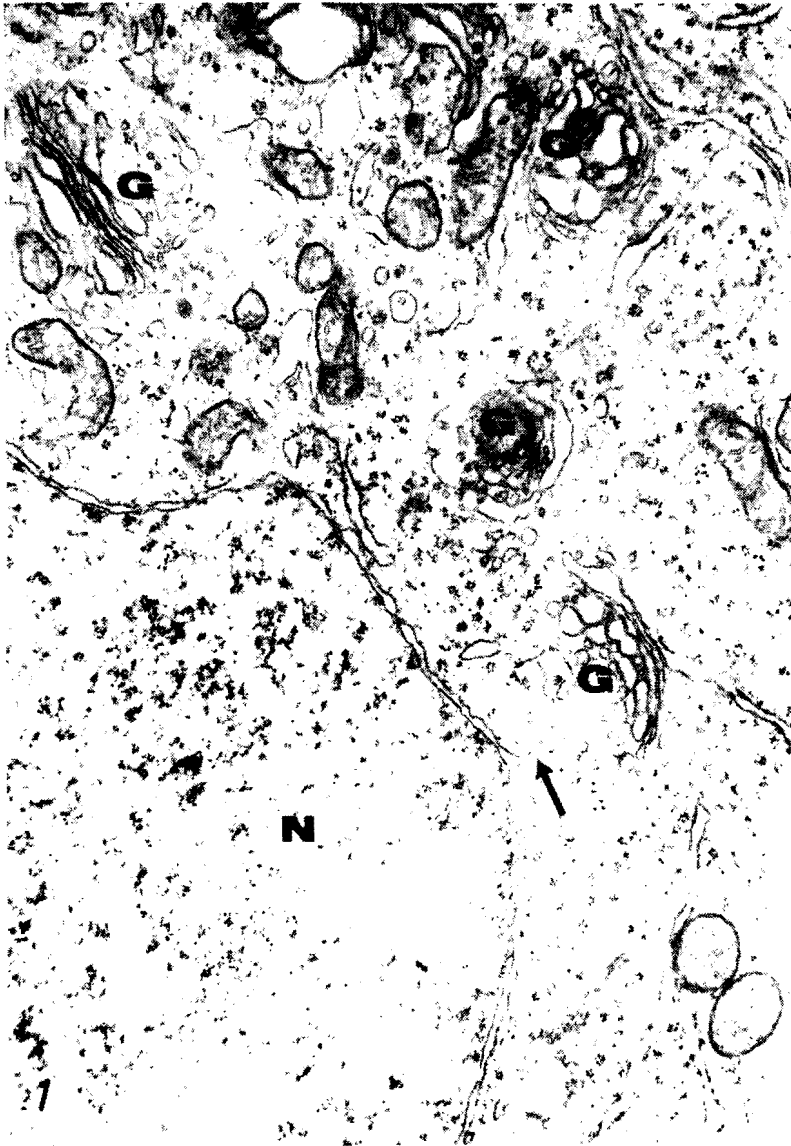


Fig. 1. Célula nerviosa de un ratón inoculado 24 horas antes con una suspensión de virus de EEV. Se observan varios complejos del Golgi (G). Alrededor del núcleo (N) se ve la cisterna perinuclear comunicándose con el retículo endoplasmático (flecha). 55.200 X.

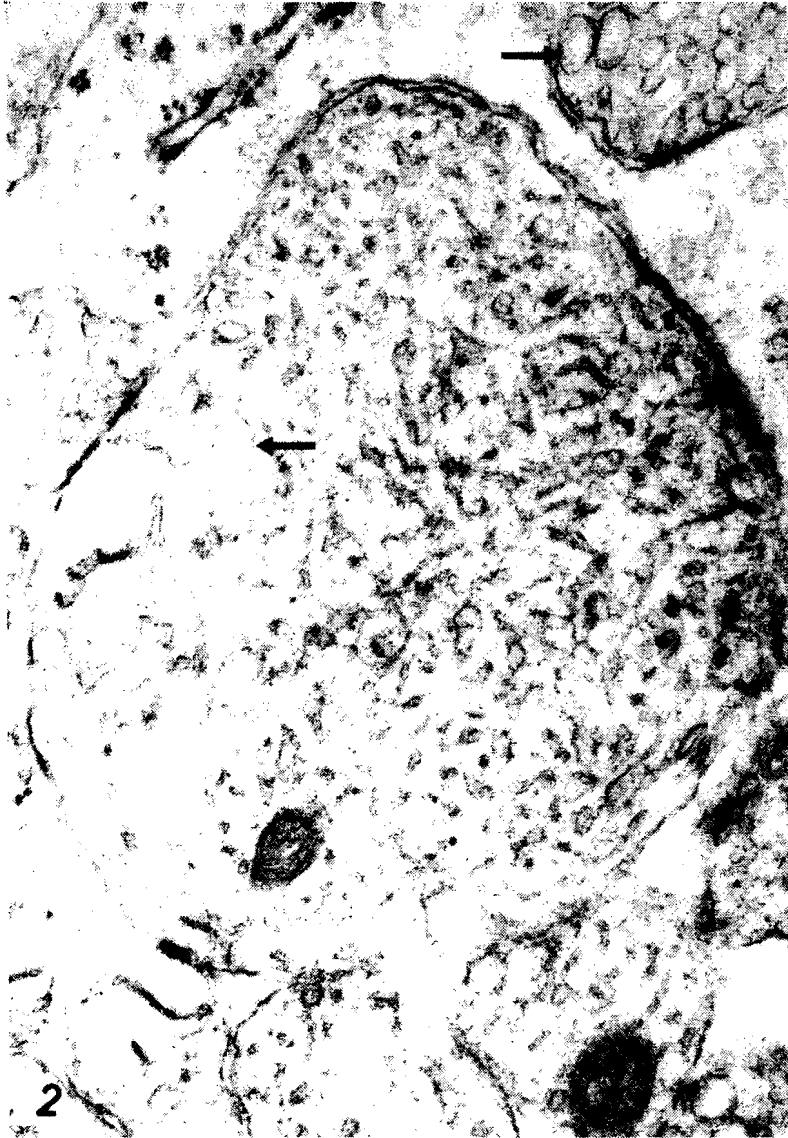
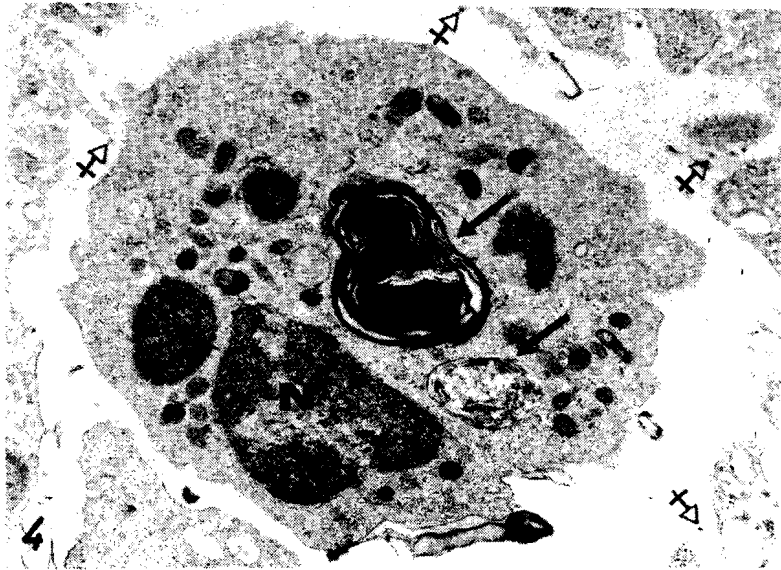
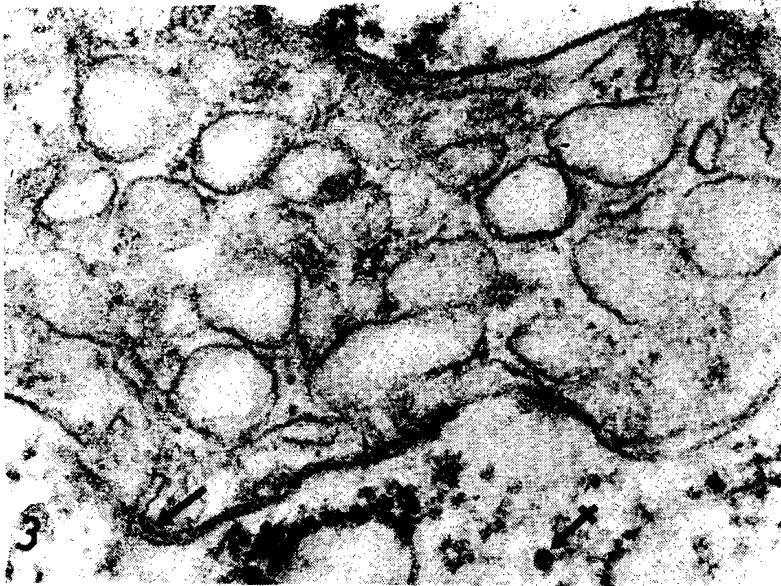


Fig. 2. Terminal sináptico con vesículas y neurotúbulos de apariencia irregular y poliédrica. Las flechas señalan vesículas sinápticas distendidas. 60.000 X.

se puede apreciar una proliferación de sus vesículas y aumento del número de sus cisternas y vacuolas (Fig. 1). En las células nerviosas del material obtenido entre 30 y 48 horas después de

la inoculación, los complejos de Golgi se observaron muy aumentados de tamaño, tomando un aspecto tubular, con largas prolongaciones y cisternas de apariencia enrollada o muy tortuo-



- Fig. 3. Mitocondria con sus crestas hinchadas con aspecto de vesículas; la flecha señala la doble membrana y parte de una cresta que ha conservado su apariencia usual. La flecha en cruz señala a una partícula precursora del virus de la EEV situada en el citoplasma, entre dos vesículas revestidas por ribosomas. 106.250 X.
- Fig. 4. Leucocito polimorfonuclear con dos vacuolas citoplasmáticas que contienen membranas (flechas). Se ve el núcleo (N) y gránulos en su citoplasma. Alrededor del leucocito se ven algunas partículas virales libres en el plasma (flecha en cruz). 20.000 X.

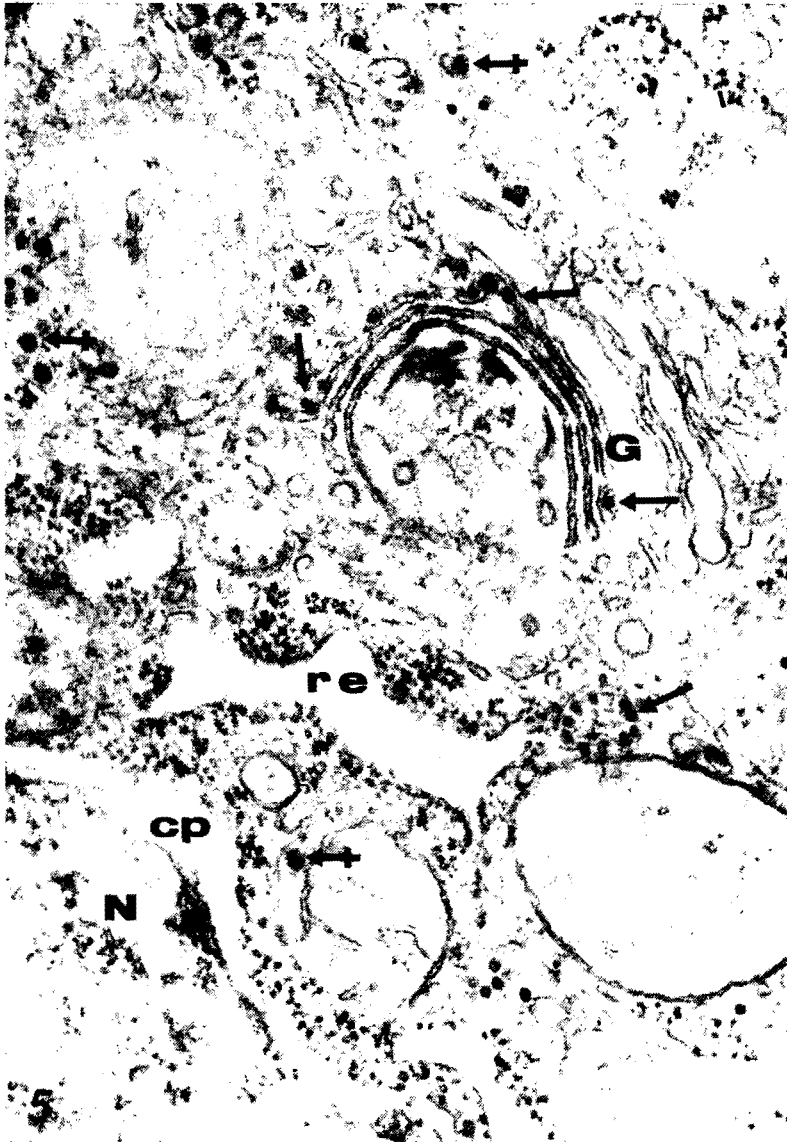


Fig. 5. Complejo de Golgi (G) mostrando algunas cisternas más estrechas, semicirculares, con varias partículas precursoras adheridas a sus membranas (flechas). También se observan algunas partículas virales maduras (flechas en cruz) dentro de las vesículas y cisternas. Alrededor del núcleo (N) se ve dilatación de la cisterna perinuclear (cp) y del retículo endoplasmático (re). 60.000 X.

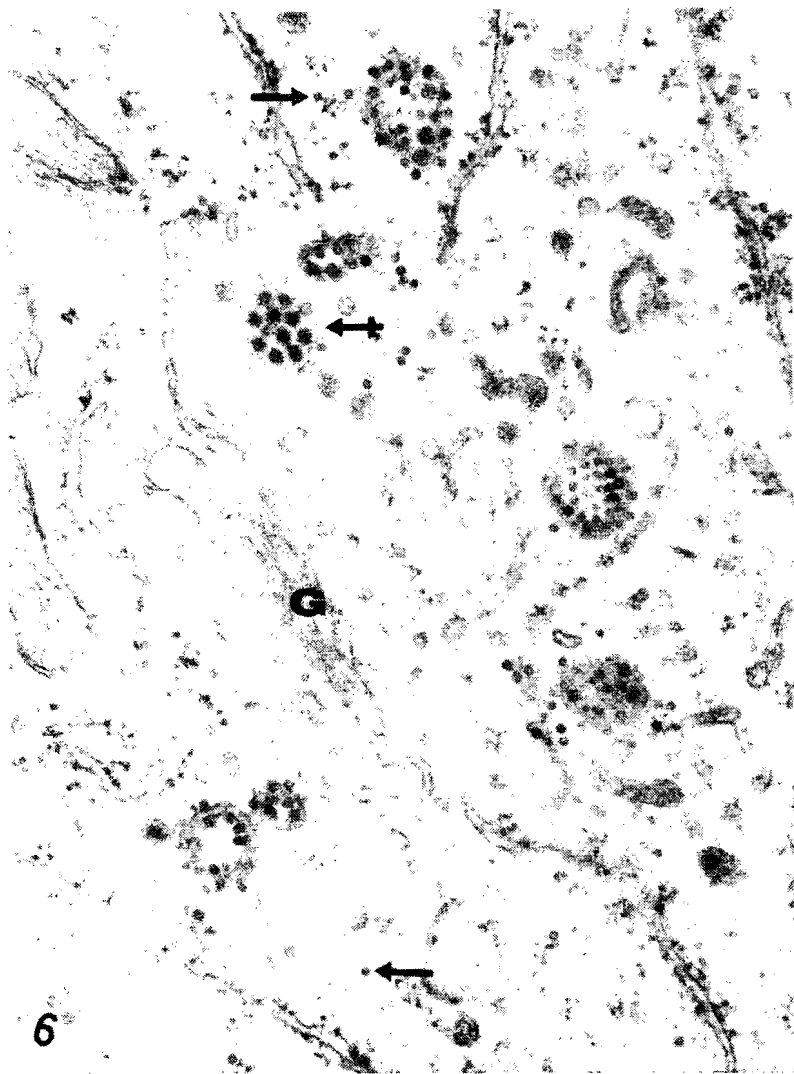


Fig. 6. Complejo de Golgi (G) con proliferación de sus cisternas tubulares, algunas dispuestas en forma de anillo. Se ven abundantes precursores virales libres en el citoplasma (flechas) y adheridos a las membranas de las cisternas. Un grupo de partículas virales maduras es señalado por la flecha en cruz. 60.000 X.

sa (Figs. 5, 6, 14, 15). Algunas de estas cisternas se disponían en forma circular, uniéndose para formar anillos de apariencia esférica, algunos de ellos limitados en su interior y exterior

por partículas redondas, de 28 a 30 milimicras de diámetro (Figs. 14 y 15).

Algunas células nerviosas mostraban marcada vacuolización del citoplasma y otras, en aparente es-

tado de necrosis, presentaban un aspecto granular con ruptura de las membranas de sus organoides y masas osmiofílicas con abundantes ribosomas en su citoplasma (Fig. 7). Las mitocondrias presentaron ruptura y vesiculización de las crestas y en ocasiones figuras mielínicas en la matriz (Figs. 3, 5, 23). Se observaron algunas sinapsis con vesículas alargadas o poliédricas y dilatación del terminal presináptico (Fig. 2).

En la luz de los vasos sanguíneos de los ratones se hallaron partículas semejantes, pero rodeadas por un halo claro y median 45 milimicras de diámetro (Figs. 4, 17, 18). Estas partículas, con el aspecto que caracteriza a los nucleoides y envolturas virales, mostraban en su superficie proyecciones de aspecto borroso las cuales median entre 15 y 20 milimicras (Figs. 17, 19). La envoltura de las partículas estaba formada por una estructura semejante a la llamada unidad de membrana y tenía un espesor aproximado de 100 Angströms.

Con frecuencia se vieron en el citoplasma de las células nerviosas masas de material granular, sin límites precisos, similares a la cromatina, notándose en la periferia la presencia de partículas redondeadas de 28 a 30 milimicras, algunas densas, otras con la parte central algo más clara, pero en general de estructura granular, y las cuales parecían nacer por condensación del material granular (Figs. 10, 11, 12). Partículas similares en forma y tamaño se vieron aisladas en el citoplasma de las células nerviosas

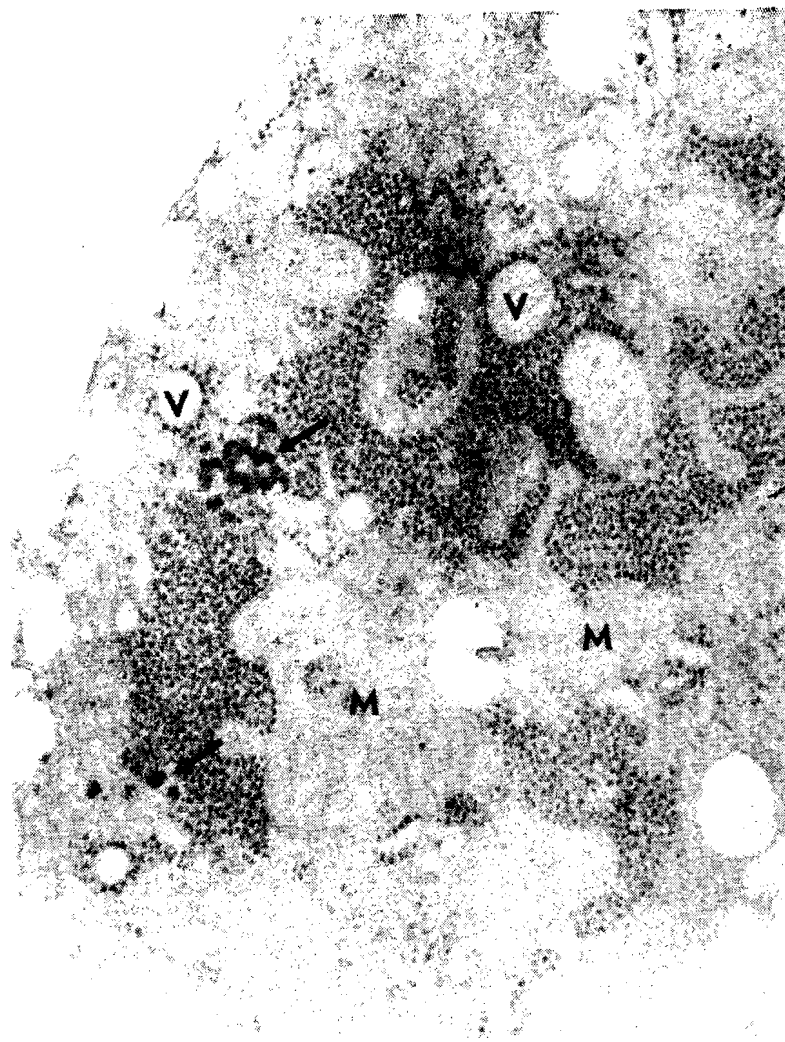
(Figs. 3, 6, 8, 14, 16), o con mayor frecuencia, adheridas a las membranas del retículo endoplasmático del aparato de Golgi y de vesículas y vacuolas presentes en el citoplasma (Figs. 5, 6, 8, 14, 15).

A menudo se vieron partículas penetrando en la luz de las cisternas y vesículas del complejo de Golgi o en las vacuolas citoplasmáticas (Figs. 14, 15). Este mecanismo parecía cumplirse por la incorporación de la membrana de las cisternas o vacuolas en la superficie de las partículas, de manera que estas, al penetrar en los espacios del sistema vacuolar, se rodean de una envoltura de aproximadamente 10 milimicras de espesor.

Las partículas de 28 a 30 milimicras también se vieron adheridas a la membrana plasmática, y en ocasiones saliendo por gemación de las células, adquiriendo al hacerlo una envoltura formada por la membrana celular (Fig. 16). Algunas células mostraron en su membrana proyecciones en forma de vesículas haciendo prominencia hacia el espacio intersticial (Figs. 10 y 26).

Alrededor de algunas vainas mielínicas se vieron grupos de partículas de 45 milimicras de diámetro (Fig. 13). En ocasiones estas mostraron organización paracristalina.

Las partículas virales maduras observadas en cortes ultrafinos mostraron una forma ligeramente ovalada; el centro de las partículas mostró con frecuencia una zona más clara y el halo que las rodea presenta en su superficie pequeñas



7

Fig. 7. Célula nerviosa con aspecto necrótico mostrando grupos de ribosomas y material denso con aspecto de gránulos cromatínicos (flechas). Se ven algunas mitocondrias (M) y dilatación de vesículas del retículo endoplasmático granular (V). 60.000 X

proyecciones de contornos borrosos (Figs. 17 y 19).

El estudio del material procesado para demostrar la presencia de fosfatasa ácida en los ratones usados como

control, demostró precipitados de plomo en el aparato de Golgi y en los lisosomas de algunas células nerviosas. En los ratones inoculados se notó un aumento de los depósitos de plomo

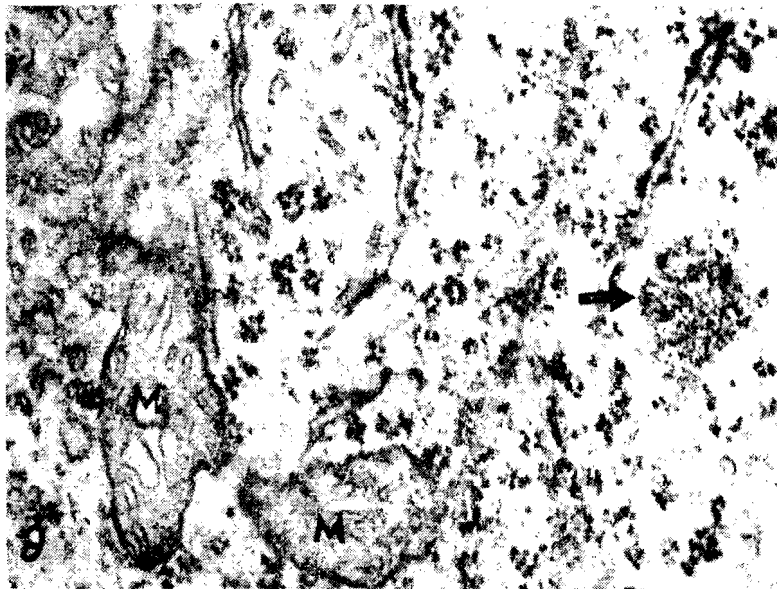
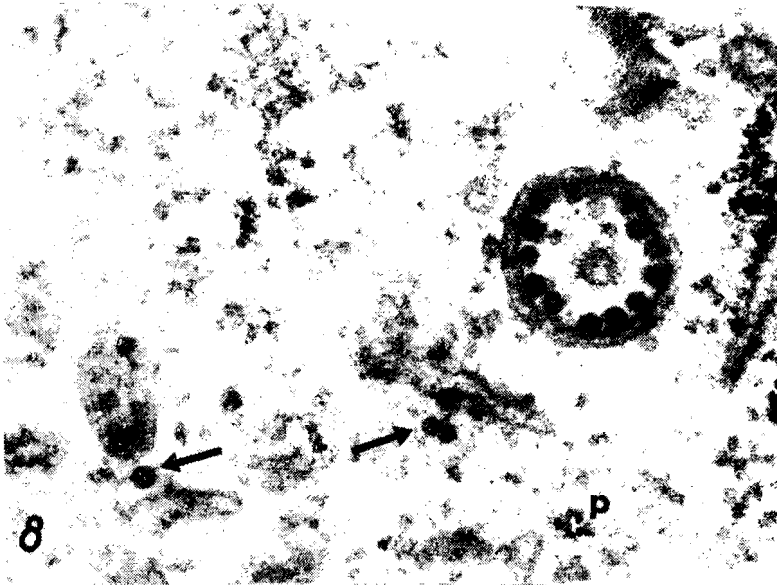


Fig. 8. Partículas precursoras libres en el citoplasma (flechas) y adheridas a una cisterna circular. Se notan escasos polisomas (p) en el citoplasma. 106.250 X.

Fig. 9. Citoplasma de una célula nerviosa en un ratón inoculado 16 horas antes con virus de EEV. La flecha señala una pequeña área formada por material granular; se ven abundantes ribosomas y dos mitocondrias (M). 60.000 X.



Fig. 10 Las flechas señalan partículas precursoras que parecen nacer en un masa de viroplasma en la vecindad del aparato de Golgi (G). Las flechas en cruz señalan proyecciones vesiculares de la membrana plasmática. 106.250 X.



Fig. 11. Masa de viroplasma y partículas precursoras (flechas). 149.500 X.

en las tortuosas y complicadas cisternas del aparato de Golgi y en los lisosomas (Figs. 20, 21, 22, 23). Algunas cisternas y vesículas mostraban partículas adheridas a sus membranas y en la luz de ellas se vieron precipitados de plomo, en ocasiones en forma de pequeños cristales o grá-

nulos (Figs. 20, 21). Con frecuencia se observaron neuronas con depósitos de plomo en forma de cristales en las cisternas del retículo endoplasmático y en la cisterna perinuclear; estas neuronas también mostraban signos de actividad de fosfatasa ácida en el aparato de Golgi y en los lisosomas



Fig. 12. Dos masas de viroplasma con partículas precursoras. Las flechas señalan partículas virales maduras en el interior de una vacuola. Se ven ribosomas (r) y polirribosomas (pr). 106.250 X.

Fig. 13. Partículas del virus de la EEV en el espacio periaxónico. Axón (Ax); vaina de mielina (flechas). 106.250 X.

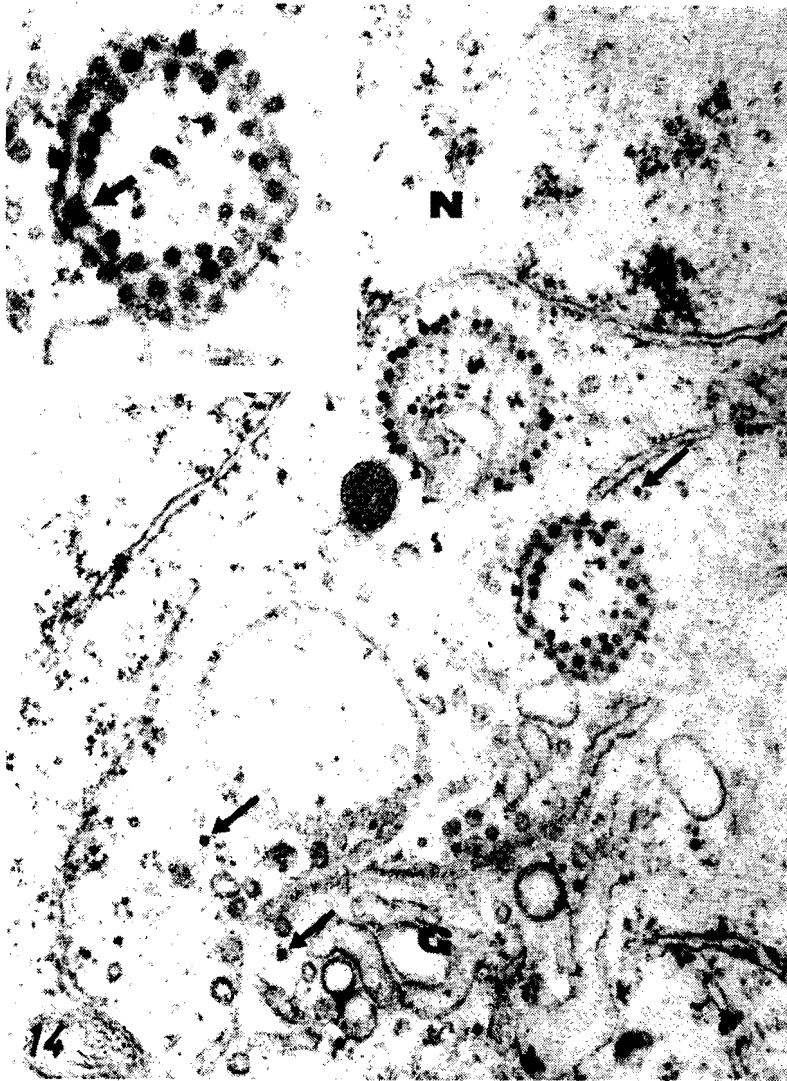


Fig. 14 Partículas precursoras adheridas a la membrana de cisternas tubulares de forma circular, situadas en la vecindad del complejo de Golgi (G) y del núcleo (N). Las flechas señalan algunas partículas precursoras en el citoplasma. En el recuadro del extremo superior se observa con mayor aumento una cisterna en anillo, en la cual una partícula precursora penetra hacia su luz por gemación (flecha). 55.200 X. Recuadro: 106.250 X.

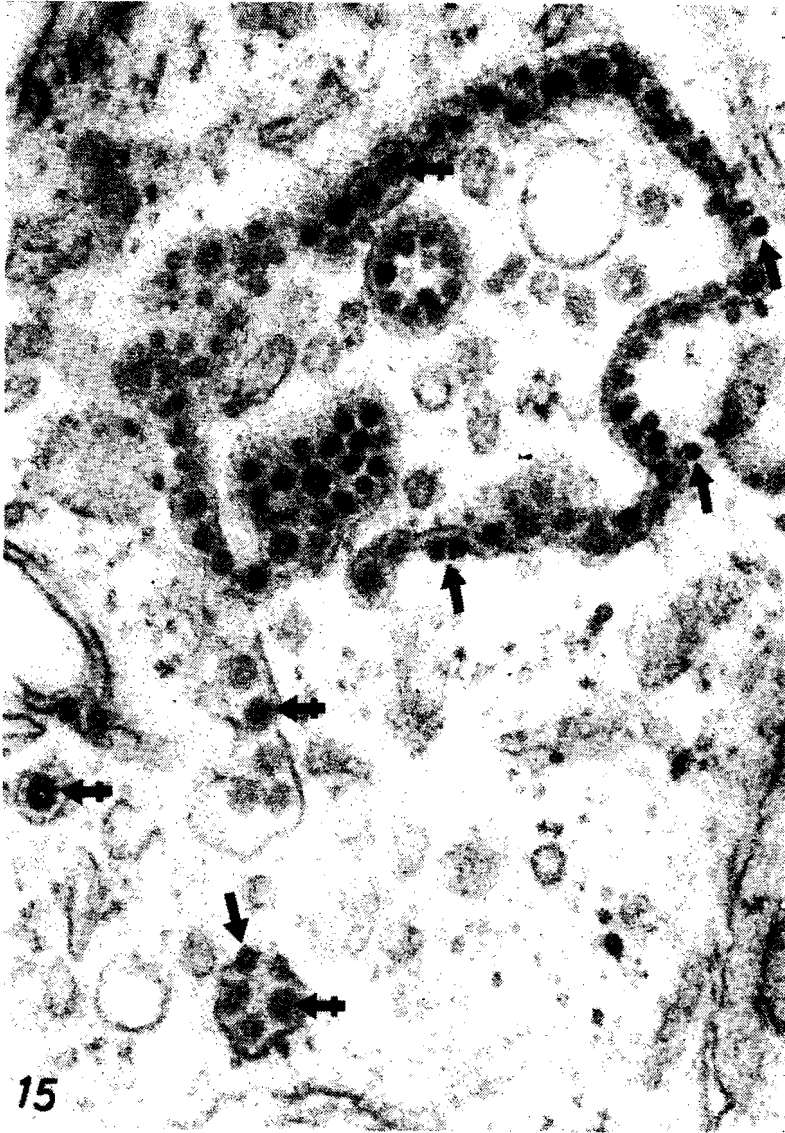


Fig. 15. Tortuosas cisternas del complejo de Golgi mostrando partículas precursoras adheridas a su membrana (flechas) y penetrando en su luz para transformarse en partículas virales (flechas en cruz). 106.250 X.

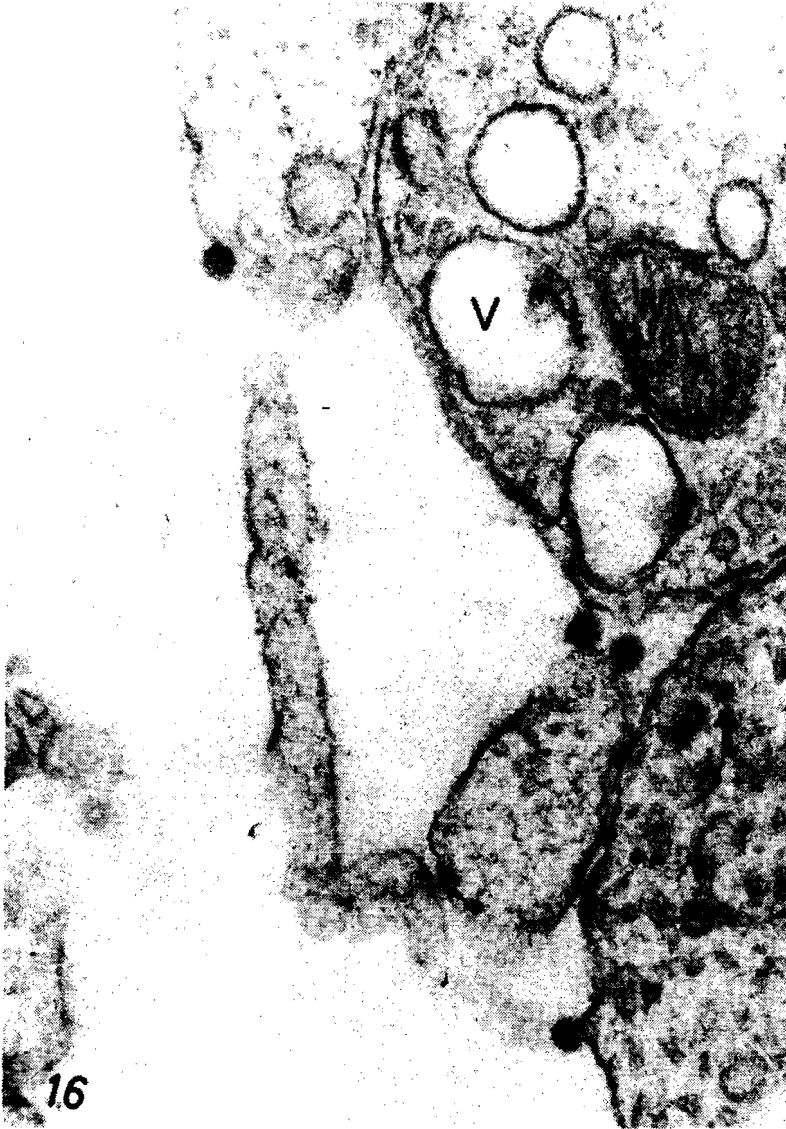


Fig. 16. Partículas del virus de la EEV en el espacio intercelular. En la parte inferior de la fotografía se ve una partícula viral saliendo por gemación de la membrana plasmática. En el citoplasma se ve una partícula precursora (flecha), una mitocondria (M) y vacuolas (V). 106.250 X.

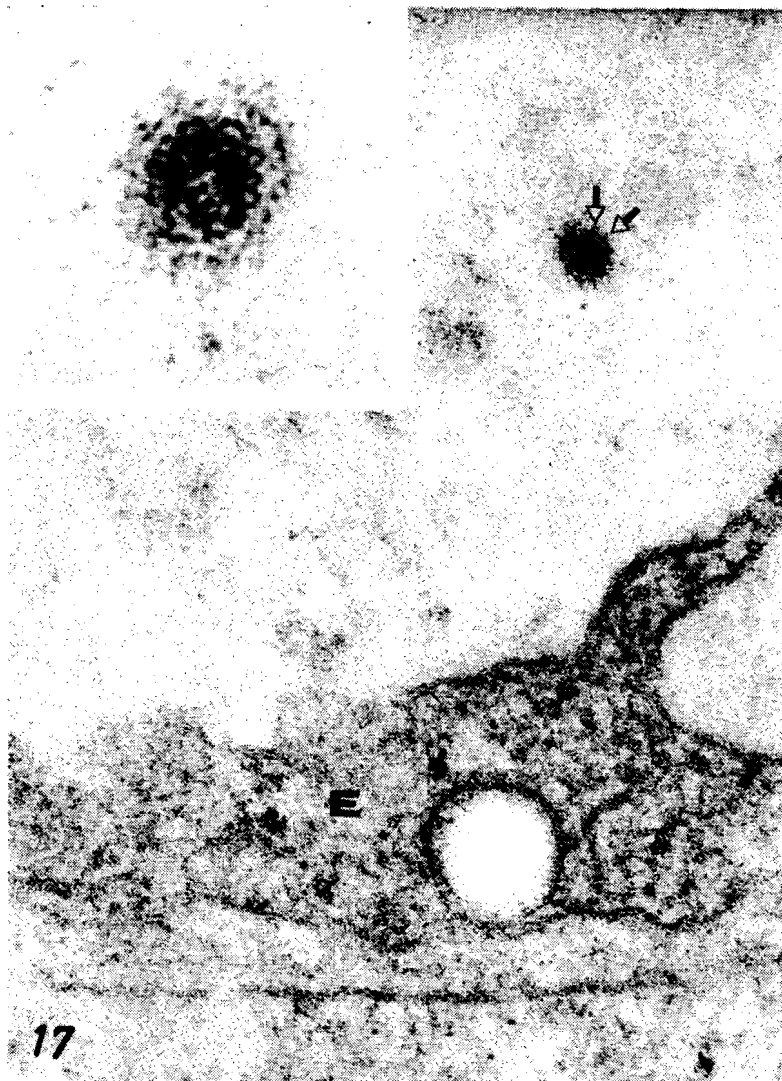


Fig. 17. Partícula viral en la luz de un vaso sanguíneo. Se observan con claridad las proyecciones en la superficie de la envoltura viral (flechas). En el endotelio (E) no se notan alteraciones. En el extremo superior izquierdo se ve la misma partícula con mayor aumento, notándose mejor la zona lúcida en el centro del nucleocápsido. 162.500 X.

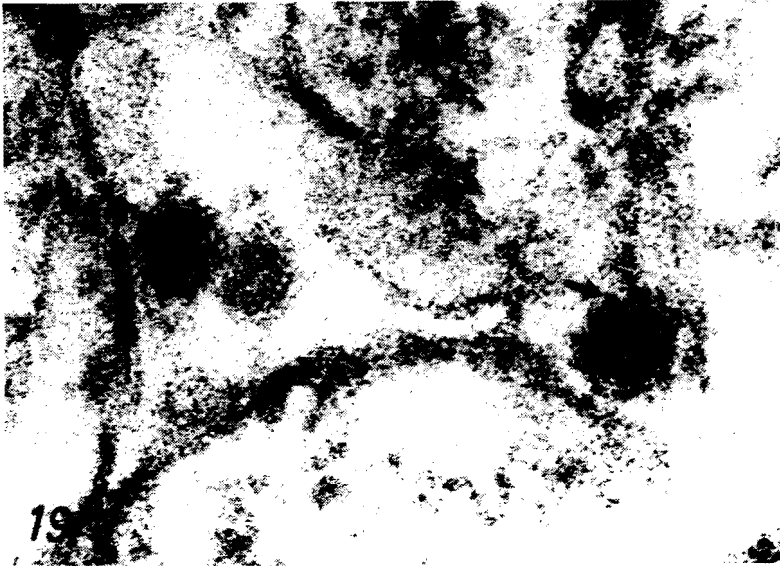
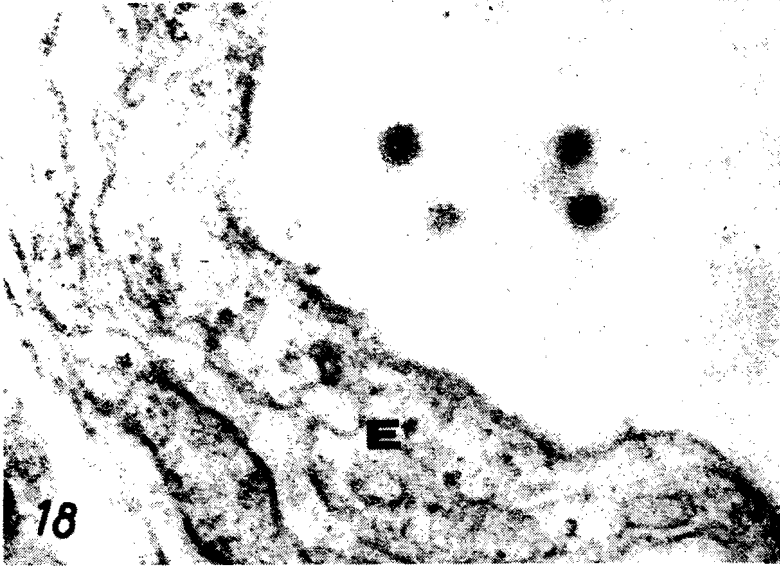


Fig. 18. Partículas virales en la luz de un vaso sanguíneo. En el endotelio (E) se ven vesículas de pinocitosis. 106.250 X.

Fig. 19. Partículas del virus de la EEV, en las cuales se ven con claridad la lucidez central del nucleocápsido y las proyecciones en la superficie de la envoltura (flecha). 250.000 X.

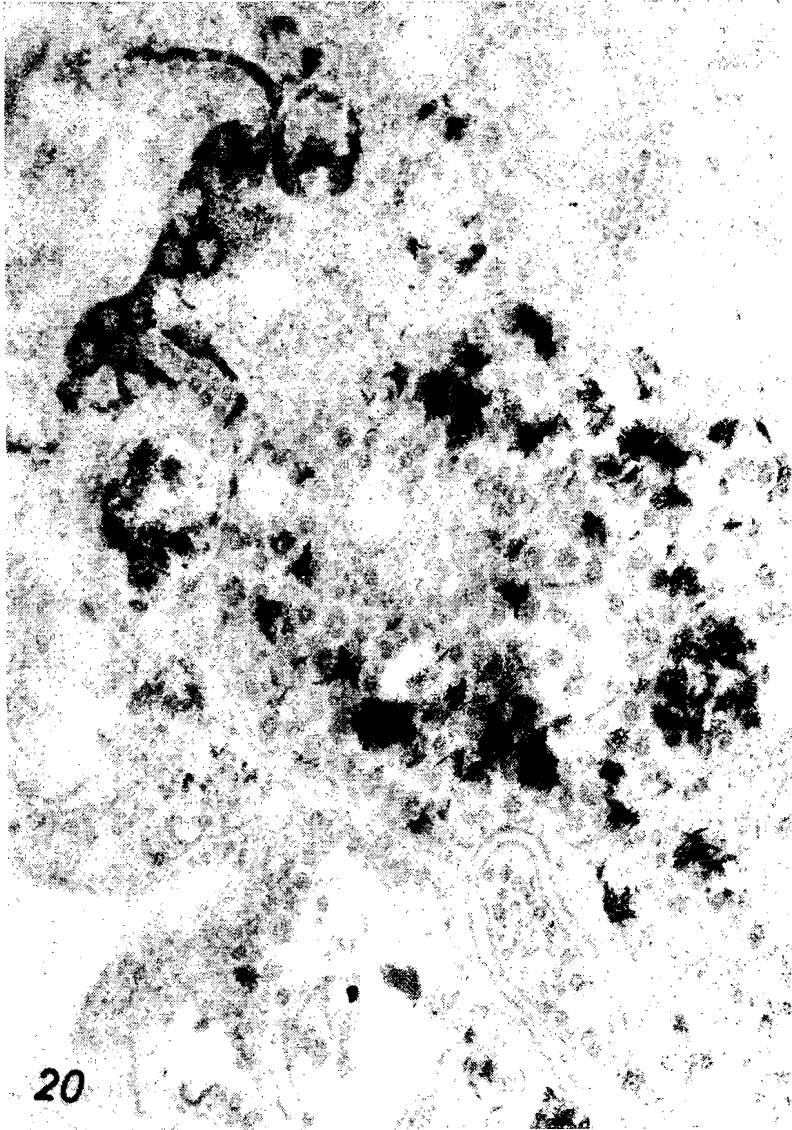
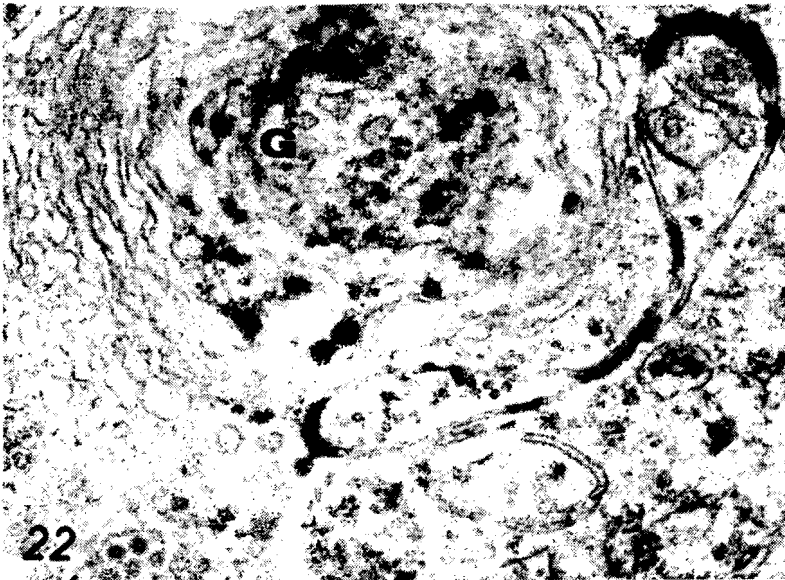
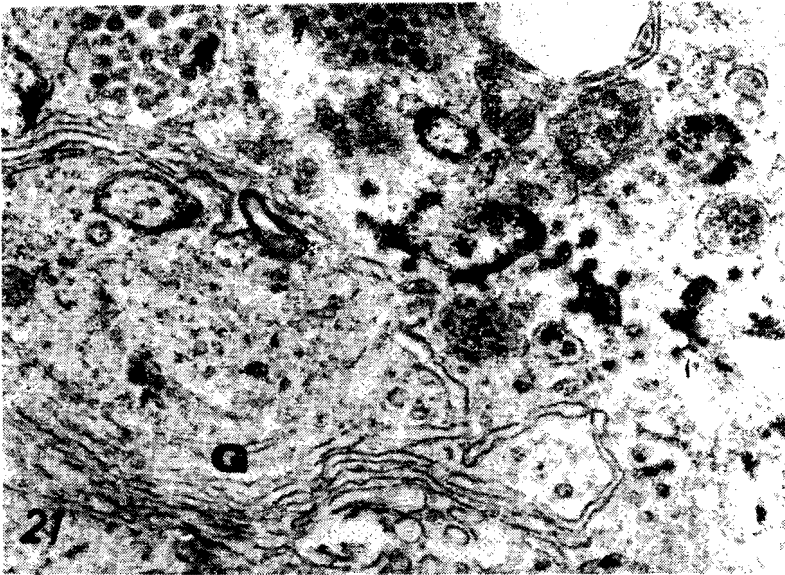


Fig. 20. Microfotografía electrónica que demuestra la actividad de la fosfatasa ácida en el citoplasma de una célula nerviosa. Se ven depósitos de acetato de plomo entre numerosas partículas precursoras y partículas virales. Método de Gomori y tinción con acetato de uranilo. 106.250 X.



Figs. 21 Partículas precursoras y virus de la EEV en vacuolas y cisternas del complejo del y 22. Golgi (G). Se nota el exagerado desarrollo de las cisternas tubulares en las que se depositan los cristales de plomo que marcan la actividad de la fosfatasa ácida. 60.000 X.

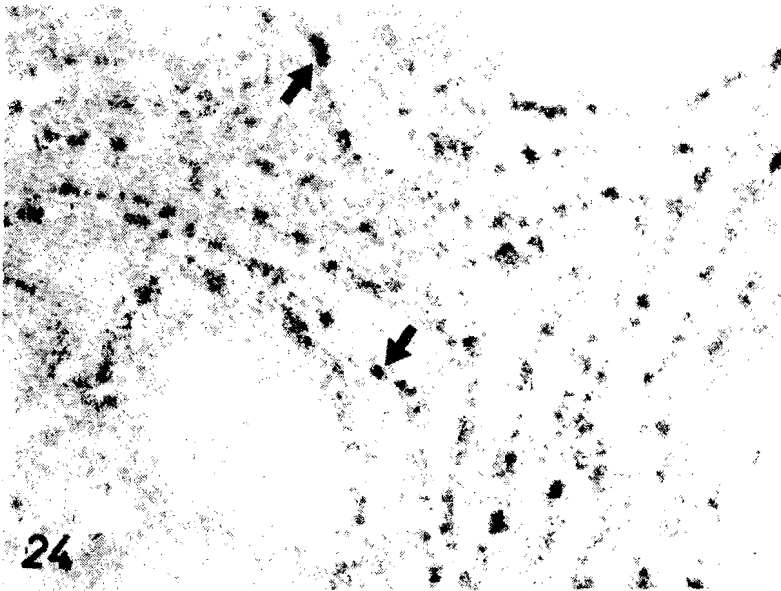
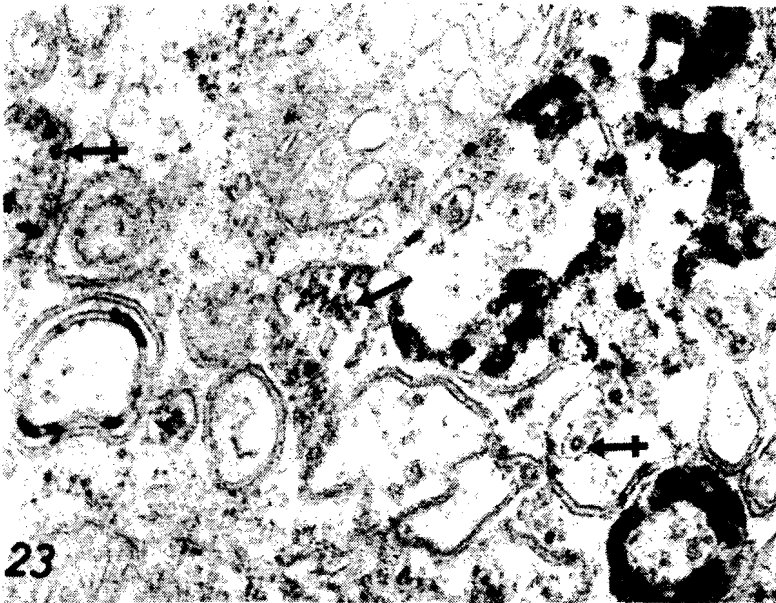


Fig. 23. Tortuosas cisternas del complejo de Golgi mostrando actividad de fosfatasa ácida. En algunas áreas dilatadas se ven partículas virales (flechas en cruz), y en citoplasma, las flechas señalan las partículas precursoras. 60.000 X.

Fig. 24. Las flechas señalan los depósitos de acetato de plomo en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso de una neurona 60.000 X.

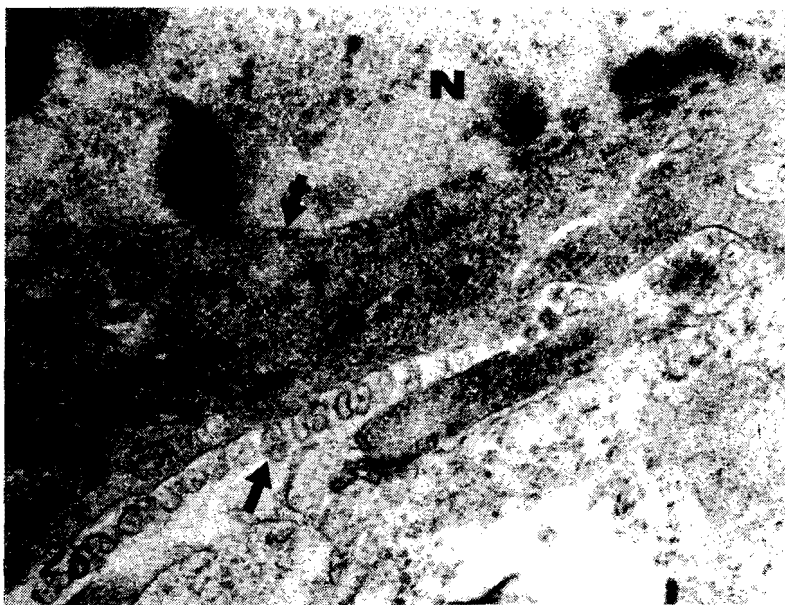
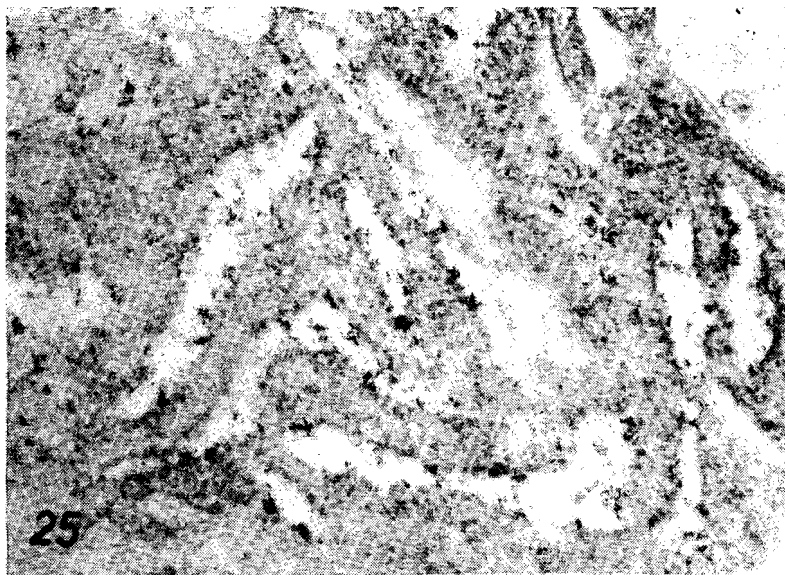


Fig. 25. Cisternas del retículo endoplasmático rugoso, mostrando cristales de acetato de plomo que marcan la actividad de la enzima fosfatasa ácida. 60.000 X.

Fig. 26. Célula nerviosa con actividad de fosfatasa ácida demostrada en la cisterna perinuclear (flecha en cruz). La cromatina en el interior del núcleo (N) está organizada en masas que se adhieren a la membrana nuclear. En la superficie de la membrana plasmática se ven proyecciones vesiculosas hacia el espacio intercelular (flecha). 60.000 X.

(Figs. 24, 25). Algunas neuronas de citoplasma osmiofílico y granular con apariencia necrótica mostraban precipitación en granos de plomo, o áreas extensas cubiertas por un precipitado de plomo más fino.

DISCUSION

Alteraciones ultraestructurales e histoquímicas del tejido nervioso.

Al estudiar las alteraciones del tejido nervioso en los ratones inoculados con el virus de la EEV, discutiremos en primer lugar el significado de los hallazgos en las células gliales y en las neuronas, especialmente los cambios observados en algunas estructuras celulares, tales como mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi y vacuolas citoplasmáticas. Posteriormente examinaremos los resultados histoquímicos discutiendo el papel del virus de la EEV en la actividad de la enzima fosfatasa ácida a nivel del sistema vacuolar citoplasmático y de los lisosomas.

La presencia de astrocitos con citoplasma hinchado y vacío fue un hallazgo constante, observándose distensión de los procesos pedales alrededor de los vasos sanguíneos y frecuentes partículas de glicógeno beta en el citoplasma, algunas de ellas agrupadas dentro de vesículas. Se ha reportado aumento del glicógeno en la astroglia, en heridas penetrantes (64) e irradiación del cerebro (47) y en la vecindad de tumores cerebrales (58); nosotros lo hemos reportado también en el tejido nervioso de equinos que presentaban

signos clínicos e histopatológicos de encefalitis (Resultados presentados en el VII Congreso Latinoamericano de Patología. Buenos Aires, Argentina, 1969). Recientemente se ha demostrado histoquímicamente, que en los astrocitos de monos con asfisia intrauterina inducida experimentalmente, se observaba aumento de gránulos de glicógeno en el citoplasma (50); este hallazgo se ha relacionado con alteraciones en los mecanismos enzimáticos de las neuronas, específicamente con la disminución de algunas enzimas respiratorias.

En los ratones recién nacidos inoculados con el virus de la EEV, el aumento del glicógeno en las células gliales no es tan marcado como el observado en equinos con encefalitis (García Tamayo, J. Resultados no publicados). Es muy probable que en ambos casos la infección viral provoque la inhibición de la síntesis proteica de las neuronas y aumente su actividad proteolítica, alterando algunos de los sistemas enzimáticos que regulan el metabolismo de la glucosa y provocando los depósitos de glicógeno descritos. Al discutir la actividad de la fosfatasa ácida en las neuronas de los ratones inoculados, mencionaremos algunos aspectos ultraestructurales e histoquímicos relacionados con las posibles alteraciones metabólicas inducidas por el virus de la EEV en las células nerviosas.

Los cambios observados en las mitocondrias de las células nerviosas, variaron de acuerdo al tiempo de inoculación y de célula a célula;

fueron más marcados en los ratones sacrificados 35 y 48 horas después de la inoculación y en particular, en las células nerviosas que mostraban partículas virales en su citoplasma. Estos hallazgos coinciden en parte con las observaciones hechas por Núñez Montiel (57) sobre la apariencia de las mitocondrias en células cultivadas infectadas con el virus de la EEV, las cuales a pesar de su evidente resistencia física, se mostraban alteradas, posiblemente debido al daño celular en la etapa final de la infección. Los cambios en la estructura de las mitocondrias al igual que los observados en los ribosomas representan una evidencia morfológica de la acción del virus de la EEV sobre las células nerviosas y van a reflejar el desequilibrio existente en los diversos sistemas metabólicos del tejido nervioso, como consecuencia de la infección viral.

Es conveniente hacer algunas consideraciones sobre la síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas de las células nerviosas, y brevemente, revisar la relación existente entre estas funciones, la ultraestructura celular y las modificaciones inducidas por la infección viral. El estudio de estos aspectos reviste gran interés, no solamente por la importancia que tiene el metabolismo proteico en el tejido nervioso, sino también porque algunos de los conceptos expuestos servirán de base para interpretar posteriormente los resultados histoquímicos.

Normalmente, el ARN celular se sintetiza en moldes de ADN a nivel del núcleo (13). Se sabe que en las

infecciones producidas por virus ARN, el ADN celular no interviene en la síntesis del ARN viral, de modo que el ARN viral no transfiere su información al ADN celular, actuando él mismo como molde para la síntesis del ácido nucleico y proteína viral (30). A pesar de los conocimientos que en la actualidad existen sobre la formación de ARN viral, es poco lo que se sabe sobre los mecanismos por los cuales los virus ARN alteran los sistemas celulares. Tampoco se conoce con claridad cómo se desarrollan la mayor parte de los virus ARN; algunos virus como los del mosaico del tabaco, parecen ensamblarse por un proceso similar a la cristalización (40); los mixovirus han sido exhaustivamente estudiados, pero su síntesis difiere en aspectos fundamentales con la de otros virus ARN (35); entre los arbovirus del grupo antigénico A, los estudios con el microscopio electrónico sobre el desarrollo de sus partículas son en parte contradictorios (49, 52), no existiendo un concepto claro sobre el papel de las llamadas partículas precursoras en la replicación viral. Se sabe que algunos virus que poseen ARN provocan una disminución de la síntesis del ARN celular (67); este fenómeno es producido por un proceso de interferencia con la polimerasa-ARN dependiente del ADN celular, mecanismo este semejante a la acción del Actinomicin D sobre la síntesis del ARN nuclear (60). En lo que se refiere a la síntesis proteica, también se sabe que esta se detiene en la células, poco tiempo después de la infección

viral (10) y al parecer este fenómeno no depende exclusivamente de la inhibición de la síntesis del ARN celular inducida por el virus (19). Al inhibirse la síntesis de las proteínas, disminuye el número de polisomas y posteriormente, cuando se está sintetizando el ARN viral, se produce un aumento de los polisomas, los cuales ya contienen proteínas formadas bajo el control viral (30).

La disminución del número de polisomas en las células que presentaban abundantes partículas virales, ha sido observada con marcada frecuencia en nuestros ratones inoculados, pudiendo apreciarse también, cómo aumentaba el número de ribosomas en algunas células que mostraban un aspecto muy alterado, adquiriendo los ribosomas la forma de racimos o de áreas extensas con apariencia multigranular. Grimley (32) ha llamado la atención sobre los agregados de ribosomas en células con infección avanzada por el virus Semliki Forest (SFV), afirmando que estos deben representar morfológicamente el aumento de la síntesis directamente inducida por el virus. Estos hallazgos están de acuerdo con nuestras observaciones ultraestructurales y con los conceptos emitidos previamente sobre el comportamiento de las unidades formadoras de proteína en las células afectadas por el virus ARN.

La organización helicoidal de los ribosomas, descrita por nosotros en las células nerviosas de los ratones inoculados con el virus de la EEV, se ha reportado previamente en algunos tejidos animales (48, 71) y vege-

tales (36), y se ha relacionado con la formación de un ARNm especial, el cual habría sufrido una modificación transitoria (36, 71). También hemos observado polisomas con organización helicoidal en el tejido nervioso de ratones recién nacidos inoculados intracerebralmente con una suspensión de virus Nariva (Walder R. y García-Tamayo J. Resultados no publicados). Se han descrito polisomas helicoidales en el citoplasma de células cultivadas (72), sugiriendo que este fenómeno puede producirse sin que medien factores de índole anormal; sin embargo, la similitud de los polisomas helicoidales encontrados por nosotros en las células nerviosas de ratones inoculados con dos virus diferentes, y la aparente relación entre los polisomas y las partículas virales o las masas de viroplasma, nos llevan a pensar que en los ratones inoculados con el virus de la EEV, es este virus el responsable de la formación de los polisomas helicoidales y que posiblemente estas estructuras estén relacionadas con la síntesis de proteínas y de ARN de naturaleza viral.

En general, la dilatación del retículo endoplasmático, la formación de vesículas en el citoplasma y la presencia de grandes y tortuosos complejos de Golgi, estuvieron siempre presentes en las células nerviosas de los ratones inoculados. La complejidad de la estructura del aparato de Golgi, la proliferación aparente de sus cisternas y vesículas y la dilatación del retículo endoplasmático, ya habían sido demos-

tradas en células cultivadas infectadas con el virus de la EEV (57).

La mayoría de los investigadores consideran que las vacuolas o vesículas que van a servir de base para la replicación de los arbovirus del grupo antigénico A, provienen de las membranas del complejo de Golgi (42, 49, 57); sin embargo, no se ha reportado una confirmación morfológica precisa sobre el sitio de ensamblaje de las partículas virales. Algunos estudios con el microscopio electrónico muestran partículas precursoras que parecen migrar desde las membranas a través del citoplasma, para salir al exterior (52), otros las muestran en la periferia de las vesículas, pareciendo en ocasiones penetrar al interior de ellas (16, 33, 49); corrientemente la formación de partículas virales maduras se describe en el momento de producirse la adquisición, por parte del nucleocápsido viral, de una envoltura derivada de la membrana celular (2, 33, 49). Estas interpretaciones sobre la formación de partículas virales, se refieren primariamente a la parte final del ensamblaje, es decir, a la formación de la envoltura para el precursor viral. En este fenómeno no se ha logrado demostrar con el microscopio electrónico, la participación del aparato de Golgi y de sus membranas, ni se ha podido visualizar ninguna relación morfológica entre el complejo de Golgi y los nucleocápsidos virales. Nuestros hallazgos hablan de una decisiva e importante participación del complejo de Golgi en la formación de la envoltura de las partículas

virales, demostrando con claridad una secuencia, que probablemente es común para todos los arbovirus del grupo A en la cual se presentan las partículas precursoras penetrando en el interior de las cisternas del sistema vacuolar citoplasmático, tanto del retículo endoplasmático como del complejo de Golgi y en vacuolas citoplasmáticas, incorporándose la membrana de estas estructuras para formar la envoltura viral. Estos aspectos serán discutidos con mayores detalles al estudiar el desarrollo de las partículas del virus de la EEV.

En algunas células nerviosas de los ratones inoculados, hemos descrito proyecciones en la superficie de la membrana plasmática, en forma de vesiculizaciones focales, situadas en ocasiones en la vecindad del complejo de Golgi, y de grupos de partículas precursoras. Estas vesículas son similares a las descritas en las vacuolas citopáticas tipo CPV Ib en las células infectadas con el virus Semliki Forest, cuyas membranas son señaladas por la autorradiografía como sitios de replicación (32). La presencia de estas proyecciones en la superficie de la membrana plasmática coincide morfológicamente con la interpretación de Grimley sobre la relación entre las vacuolas CPV tipo Ib y la membrana celular, proponiéndose que ambas puedan ser sitios de replicación viral (32).

También hemos observado en el citoplasma de algunas células nerviosas, vacuolas similares a las llamadas vacuolas citopáticas, tipo Ia,

Ib, Ic, descritas en células de embrión de pollo cultivadas, infectadas con el virus Semliki Forest (20, 32). Este tipo de vacuolas con proyecciones vesiculizadas en su membrana, las hemos visto en las neuronas de los ratones sacrificados dieciséis horas después de la inoculación intracerebral con el virus de la EEV; sin embargo, en el tejido nervioso su presencia es ocasional, observándose en algunas oportunidades en los leucocitos polimorfonucleares que infiltran el tejido cerebral. En este tipo de vacuolas, no hemos observado partículas virales.

Estudios de autorradiografía y de microscopía electrónica han señalado a las vacuolas citopáticas tipo I, observadas en las células cultivadas infectadas con el virus Semliki Forest, como los sitios más primitivos en la formación del ARN viral (32); estas vacuolas, que comienzan a hacerse visibles en las células cultivadas poco después de la inoculación del virus, han sido comparadas con los cuerpos globulares descritos por Yazusumi en la encefalitis japonesa (82). Se ha propuesto que las vesículas contenidas en las vacuolas citoplasmáticas constituirían las envolturas de partículas virales incompletas (2). Se ha sugerido también que las vacuolas citopáticas son producidas por fagocitosis (2), y a pesar de haberse destacado su asociación con el complejo de Golgi y el sistema lisosómico, existen estudios con medios de contraste que sugieren que, al menos la mayor parte de ellas, no son producidas por este mecanismo (32).

Nosotros hemos observado en los ratones recién nacidos inoculados con el virus de la EEV, vacuolas tipo CPV I en las células hepáticas, en las del sistema retículoendotelial, en los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares; su presencia ocasional, aunque más frecuente que en el tejido nervioso, no parece tener gran relación con las vacuolas que contienen partículas virales, sino que por el contrario, histoquímicamente algunas de ellas han mostrado actividad de fosfatasa ácida y morfológicamente están relacionadas con los sistemas celulares envueltos en los fenómenos de fagocitosis y digestión celular (García-Tamayo J. Resultados no publicados). No debe escapar a nuestra atención el hecho de que los estudios realizados con el virus Semliki Forest, se han llevado a cabo en células del sistema nervioso de los ratones.

Negrette (54) ha llamado la atención sobre la vacuolización observada en los leucocitos de frotis sanguíneos de pacientes con enfermedades virales, sugiriendo la posibilidad de que las vacuolas representan una alteración de los leucocitos provocada por la acción directa de los virus, e indicando la importancia del examen hematológico cuidadoso en las afecciones virales. La vacuolización del citoplasma de las células sanguíneas descrita en pacientes con EEV (55), podría corresponder a estructuras vesiculares, semejantes a las que hemos observado en las células sanguíneas y del sistema retículoendotelial de los ratones recién nacidos inoculados con el virus de la

EEV. Al comentar sobre el posible origen de estas vacuolas hemos indicado su probable relación con el aparato lisosómico y con los mecanismos de fagocitosis y autofagia; sin embargo, es indudable que ellas están relacionadas con la infección viral, pues no se observan en los animales utilizados como control. Queda siempre sujeta a discusión la relación existente entre los virus de la EEV y las vacuolas de las células sanguíneas; si estas son parte de los mecanismos celulares envueltos en la replicación viral como sugiere Negrette (65), o si son producidas por un incremento de la fagocitosis como consecuencia de la infección viral.

En las células nerviosas de los ratones inoculados con el virus de la EEV, se vieron estructuras vesiculosas y vacuolas redondeadas que contenían vesículas pequeñas o distendidas, las cuales guardaban ligera semejanza con los cuerpos globulares de la encefalitis japonesa (82); en algunas células nerviosas estas estructuras parecían originarse por hinchamiento de las crestas de las mitocondrias. Algunas sinapsis mostraron vesículas alargadas de formas poliédricas o irregulares, similares a las descritas en ciertas condiciones patológicas del sistema nervioso (28, 29, 61); estas sinapsis de aspecto alterado, fueron observadas principalmente en las muestras provenientes de los ratones sacrificados 16 y 24 horas después de la inoculación.

Otro hallazgo frecuente fue el de neuronas degeneradas, con cito-

plasma osmiofílico y granular, con masas de cromatina y grupos de ribosomas, o con vacuolización marcada del citoplasma; en general, la apariencia de estas células fue similar a la reportada en células necróticas, en otras infecciones con arbovirus del grupo A (32, 49). La actividad de fosfatasa ácida en estas células alteradas fue muy intensa, en ocasiones cubriendo en forma de gránulos irregulares todo el citoplasma. Resulta interesante la observación de frecuentes partículas del virus de la EEV, en espacios alrededor de las vainas de mielina de los axones. Un hallazgo similar ha sido reportado por Yazusumi en el tejido nervioso de ratones infectados con el virus de la encefalitis japonesa B (82), observándose las partículas en el axoplasma y en el espacio intersticial periaxónico. Se podría especular sobre esta localización del virus y las rutas que este puede seguir en su diseminación e invasión del tejido nervioso cuando se liberan las partículas de las células infectadas. Nosotros no observamos partículas virales en el axoplasma, pero sí se vieron con mucha frecuencia en la periferia de las vainas de mielina. Es interesante destacar el hecho de que estos hallazgos fueron observados solamente en algunos ratones sacrificados entre 38 y 48 horas después de la inoculación con el virus de la EEV, no pudiendo precisarse todavía, si existe alguna relación entre el área del tejido nervioso examinado y las partículas virales periaxónicas. Es muy probable que los espacios intercelu-

lares, en la periferia de las vainas de mielina puedan ser una vía utilizada por el virus para invadir el sistema nervioso.

Antes de pasar a discutir la actividad de la fosfatasa ácida en las cisternas y vacuolas del aparato de Golgi y en otras zonas del sistema citoplasmático de membranas en las neuronas de los ratones inoculados, es importante mencionar algunos conceptos elementales sobre esta enzima.

La fosfatasa ácida es una enzima hidrolítica que actúa en un pH bajo y la cual parece originarse a nivel de los ribosomas (14), migrando desde allí, a través de las cisternas del retículo endoplasmático para concentrarse en el aparato de Golgi (11, 12); de sus cisternas y vacuolas se desprenden pequeñas vesículas que van a llevar la enzima hasta los lisosomas (12, 56). Esta hipótesis es aceptada como correcta por la mayoría de los investigadores, y es necesario tenerla presente al discutir el significado de la localización ultraestructural de los depósitos de plomo, que utilizando el método de Gomori, marcan los sitios de actividad enzimática en las células.

En estudios de histoquímica aplicada a la microscopía electrónica realizados en la Universidad de Wisconsin durante los años 1966 y 1967, reportamos la actividad de la fosfatasa ácida en las células del alvéolo pulmonar del acure (25), pudiendo constatar la efectividad del método de Gomori en otros tejidos de animales de experimentación; algunos de estos experimentos se

efectuaron en acures sometidos a condiciones anormales, tales como ayuno (García-Tamayo, J. y Valdivia E. Resultados no publicados), hipoxia crónica (76), intoxicación con etionina (77), y con CCl₄ (75).

Estos estudios sobre la localización de la fosfatasa ácida en condiciones normales y patológicas, y algunos trabajos de investigación en histoquímica aplicada al microscopio electrónico que se realizan actualmente en nuestro laboratorio (Vallejos- Escobar, R. E. Comunicación personal), nos permiten hacer algunas consideraciones sobre el significado de los resultados obtenidos con el método de Gomori, en los ratones inoculados con el virus de la EEV.

La actividad de la fosfatasa ácida fue demostrada en las cisternas del retículo endoplasmático y con mayor intensidad en el complejo de Golgi y en los lisosomas de numerosas neuronas de los ratones inoculados. La presencia de precipitado de plomo en el aparato de Golgi fue constante y siempre la reacción fue intensamente positiva, al igual que en algunos lisosomas y en células completamente degeneradas. La positividad de la actividad de fosfatasa ácida en las cisternas del retículo endoplasmático es un hecho de mucha significación. Por el contrario, no se observó en animales utilizados como control, ni conocemos reportes previos que muestren una positividad tan marcada para la fosfatasa ácida como la observada por nosotros en esta localización. Conviene preguntarse hasta qué punto es

posible ubicar los sitios de actividad de la enzima basándose en la localización de los depósitos de plomo; normalmente estos parecen estar situados en el espacio libre de las cisternas, y en ocasiones se observan adheridos a las membranas del complejo de Golgi. Con frecuencia se vieron depósitos de plomo en las membranas de cisternas y vacuolas, a las cuales estaban adheridas partículas virales precursoras, notándose cómo algunas partículas virales maduras, recién formadas por la incorporación de las membranas del aparato de Golgi en el nucleocápsido viral, mostraban pequeños depósitos de plomo en su superficie. Si bien es cierto que estos detalles deben observarse con mucha cautela, considerando siempre la posibilidad de estar en presencia de artificios, tan frecuentes al utilizar el método de Gomori aplicado al microscopio electrónico, la ausencia del precipitado en otras zonas y la nítida y constante localización ultraestructural de la reacción, nos permite afirmar que los depósitos de plomo en las células de los ratones están marcando con precisión los sitios de actividad de la enzima.

En este estudio hemos aplicado una variante del método de Gomori, utilizando beta glicerofosfato de sodio como sustrato con acetato de plomo para marcar los sitios de actividad de la enzima, y con acetato y cacodilato como soluciones amortiguadoras. Las muestras obtenidas sin precipitado visible, se procesaron sin las dificultades técnicas que hemos podido observar utilizando el

medio de Gomori preparado con nitrato de plomo y tris-maleato como solución amortiguadora (García-Tamayo J. y Valdivia E. Universidad de Wisconsin, Dep. de Patología. Resultados no publicados).

Otros aspectos interesantes de los hallazgos histoquímicos son: La exagerada actividad de la fosfatasa ácida en los tortuosos complejos de Golgi, si se comparan los ratones inoculados con los controles, y la presencia de depósitos de plomo en las cisternas del retículo endoplasmático y en las cisternas perinucleares. Estos hallazgos señalan que, en las células nerviosas afectadas por el virus de la EEV, se produce un aumento de la actividad de la fosfatasa ácida, el cual muy probablemente está relacionado con las funciones del sistema lisosómico como respuesta a la alteración de la homeostasis celular (56). Paralelamente al aumento de la actividad de la fosfatasa ácida, debe producirse un incremento de otras enzimas hidrolíticas ácidas del sistema lisosómico. La actividad de la fosfatasa ácida debe producirse como respuesta a cambios iónicos a nivel de las citomembranas (15), los cuales disminuirían el pH celular, facilitando acción de las enzimas hidrolíticas ácidas (12, 56). Pero debemos preguntarnos si puede considerarse al virus de la EEV, como un factor capaz de promover un incremento en la producción de la enzima fosfatasa ácida en las células afectadas. Es importante recordar que el ARN viral dirige la síntesis de las proteínas, se replica, y actúa como men-

sajero estimulando la producción de enzimas por las células (43). Las células que muestran partículas virales están sintetizando proteínas y ácidos nucleicos virales, y la fosfatasa ácida es una proteína que se origina a nivel de los ribosomas; de tal modo que puede plantearse el interrogante de si es esta enzima formada en exceso por acción directa del virus sobre las membranas del complejo de Golgi, o si el aumento de su actividad en las células invadidas por el virus es solamente la respuesta reactiva del sistema lisosómico de células en las cuales se está implantando un nuevo control de su código genético y de su metabolismo proteico, alterándose sus sistemas y llevándolas progresivamente hacia la muerte.

El efecto de la infección viral sobre el sistema lisosómico y sobre la actividad de la fosfatasa ácida, ha sido estudiado por Allison y Mallucci (3) en células HeLa infectadas con adenovirus y células de embrión de pollo infectadas con virus de la enfermedad de Newcastle, determinándose que en estas infecciones se producía la liberación de enzimas lisosómicas como consecuencia de la infección viral. Mallucci y Allison (45) consideraron la descarga de fosfatasa ácida en los fagosomas como un mecanismo celular implicado en la destrucción viral por ataque a la envoltura proteica. El hallazgo de un aumento progresivo de la fosfatasa ácida, desoxirribonucleasa ácida y ribonucleasa ácida en las fracciones solubles obtenidas por centrifugación en células de embrión de pollo

infectadas con el virus "Fowl plague" (45), contribuye a sostener nuestras observaciones sobre el incremento de la actividad de la fosfatasa ácida observada con el microscopio electrónico en las neuronas de los ratones inoculados con el virus de la EEV.

Creemos necesario proseguir y ampliar los estudios de histoquímica en la infección con el virus de la EEV, para comprender mejor las bases fisicoquímicas de las alteraciones celulares. Consideramos que la presencia de actividad de fosfatasa ácida en la cisterna perinuclear y cisternas del retículo endoplasmático es indicio de una producción muy activa de esta enzima, lo cual se traduce en los grandes depósitos demostrados en el complejo de Golgi y en los lisosomas.

Viremia y penetración del virus en el sistema nervioso.

La mayoría de los ratones adultos son susceptibles a la inoculación intracerebral con casi todos los arbovirus, pero son poco afectados si la inoculación se hace por otra vía; los ratones recién nacidos por el contrario, son muy susceptibles a la inoculación de arbovirus por diferentes vías. Este hecho demuestra la existencia de una variación en la permeabilidad selectiva de los vasos del sistema nervioso de los ratones, en relación con la penetración viral. Probablemente los ratones recién nacidos poseen un endotelio más inmaduro, sin membrana basal, más fácilmente permeable a las partículas virales ino-

culadas por cualquier ruta, en tanto que en los ratones adultos prevalece la selectividad de la barrera hematoencefálica. Los virus presentes en la sangre circulante pueden penetrar al sistema nervioso atravesando la pared vascular y por lo tanto, salvando la llamada barrera hematoencefálica, pero existe otra posibilidad de alcanzar el tejido nervioso y esta es, a través de los tractos olfatorios (38), especialmente en la etapa de la viremia caracterizada por la presencia de los virus en las secreciones nasales.

En la EEV, la viremia es masiva (39, 72) y la penetración del virus al sistema nervioso debe ocurrir a través de la barrera hematoencefálica; la presencia de los virus de la EEV en las secreciones nasales de algunos enfermos (18), sugiere la posibilidad de que el virus penetre al sistema nervioso por la vía de los tractos olfatorios. La presencia de abundantes partículas virales en la periferia de axones mielínicos en los cortes de los ratones sacrificados 38 a 48 horas después de la inoculación, contribuyen a sostener la hipótesis de propagación de los virus por la vía neurotrópica.

Kissling (39), reportó una altísima tasa de virus en la sangre de caballos infectados con EEV, indicando el porqué esta enfermedad es tan fácil de diseminar, cuando se hacen presentes gran número de mosquitos en el curso de una epizootia equina. Tasker y col. (72), demostraron que dos horas después de la inoculación intraperitoneal del virus de la EEV en los ratones, éste se encuentra presente en la sangre

y antes de seis horas se puede aislar de numerosos tejidos; en este estudio, la rapidez de la multiplicación y la elevada viremia, sugerían la posibilidad de que los virus se acumularan durante su desarrollo en órganos muy vascularizados como los pulmones, hígado y riñones; destacándose también las alteraciones y la alta tasa de virus presente en los órganos linfáticos, como índice de la reacción del tejido linfoide en la EEV. Estudios sobre la histopatología en diferentes especies animales (27, 68), han considerado que la denominación de encefalitis para el cuadro clínico patológico provocado por el virus de la EEV, no es del todo correcto. La afectación del tejido linfoide en la EEV parece ser un hecho constante (78); algunas especies animales presentan necrosis de los ganglios linfáticos o de la médula ósea, en tanto que en otras, predomina la meningoencefalitis o encefalomiélitis. Los estudios histopatológicos también coinciden en mostrar alteraciones de la pared de los vasos sanguíneos (27, 81). Igualmente, los hallazgos anatomopatológicos de los casos humanos reportados por Wenger (80, 81), muestran alteraciones vasculares, con hipermia y cambios inflamatorios en algunos órganos, particularmente en el pulmón. El estudio histológico del pulmón en nuestros ratones recién nacidos, inoculados con el virus de la EEV, también ha demostrado signos de neumonitis; ultraestructuralmente, las partículas virales en el pulmón son muy numerosas (García-Tamayo J. Resultados no publi-

cados). La presencia de graves malformaciones cerebrales en fetos nacidos de madres que habían padecido de encefalitis durante el embarazo, también fueron reportados por Wenger (81), y son una evidencia de la infección viral transplacentaria durante la severa fase de viremia que caracteriza la EEV. En los seres humanos, se ha demostrado que la viremia en la EEV es corta, desapareciendo el virus de la sangre después del tercer día de la infección, posiblemente por la aparición de anticuerpos neutralizantes específicos (18).

La presencia de partículas virales en el interior de los vasos sanguíneos es un hecho muy significativo, por lo poco corriente que resulta el hallazgo de un virus en el medio extracelular, y en este caso, en un medio aislado de las células nerviosas por el endotelio vascular. No conocemos reportes previos de esta localización en las infecciones provocadas por los arbovirus, y consideramos que las partículas virales observadas en la luz vascular, deben estar directamente relacionadas con la masiva viremia que se sabe existe en los casos de EEV. La misma opinión es sostenida por Lascano, quien ha observado las partículas del virus Aura en la luz de los vasos sanguíneos (Lascano E.F. Comunicación personal). Algunos estudios han pretendido demostrar la importancia de las alteraciones submicroscópicas de los endotelios en la patogénesis de las afecciones virales; pero, ante la presencia de lesiones endoteliales en el sistema ner-

vioso, persiste la duda de que si éstas son, o no, posteriores al daño celular perivascular. Estudios con el virus Sindbis (38), parecen indicar que éste es capaz de multiplicarse en el endotelio de los pequeños vasos cerebrales, antes de penetrar al sistema nervioso. Nosotros no observamos alteraciones endoteliales en el tejido nervioso de los ratones inoculados. A pesar de verse con frecuencia partículas virales en la luz vascular, estas partículas no pudieron identificarse en la superficie, ni penetrando a través de las membranas de las células endoteliales.

Desarrollo de las partículas virales.

El material genético de los arbovirus está constituido por moléculas de ARN, las cuales al penetrar en las células se localizan y se multiplican en el citoplasma (60). Para analizar detenidamente el desarrollo de los virus de la EEV en el cerebro de los ratones inoculados, es necesario discutir los resultados de algunos trabajos en los cuales se propone una interpretación ultraestructural para explicar la manera como se forman las partículas virales de diferentes arbovirus y de este modo, examinar en detalle el proceso de ensamblaje de las partículas del virus de la EEV.

Debemos recordar que los arbovirus, que invaden las células por mecanismos poco conocidos, comienzan a hacerse visibles después de la fase de eclipse. Estudios con el microscopio electrónico, han mostrado partículas precursoras de los

virus en células infectadas con diferentes arbovirus del grupo A (2, 8, 33, 49, 52, 53); sin embargo, aún no se conoce con certeza cuál es el papel de estas partículas en el proceso de síntesis y replicación viral. Los primeros reportes sobre la ultraestructura del virus de la encefalitis equina del Oeste (EEO) (49) y de la encefalitis equina venezolana (52), mostraron nucleocápsidos redondeados, considerados como precursores de las partículas virales, situados en la periferia de vacuolas o libres en el citoplasma de las células cultivadas infectadas con los virus, observándose también partículas virales maduras en el interior de vacuolas citoplasmáticas; sin embargo, la interpretación sobre el origen de las partículas virales fue contradictoria. Morgan (49) indicaba, que las partículas precursoras del virus de la EEO parecen cruzar la membrana de las vacuolas y penetrar en la luz, adquiriendo al hacerlo una cubierta periférica; pero, a pesar de lo lógico de esa secuencia, y de la presencia de partículas virales maduras dentro de las vacuolas, no se observaban muchas formas de transición. Mussgay y Weibel (52), describieron las partículas del virus de la EEV con el microscopio electrónico en las células KB cultivadas, proponiendo que los virus maduran en las membranas citoplasmáticas y van desprendiéndose, migrando a través del citoplasma hacia la superficie de la célula, donde se liberan. Núñez-Montiel (57) también describió las partículas del virus de la EEV en el citoplasma vacuolizado

de células cultivadas infectadas con ese virus, pero no emitió comentarios sobre el posible origen de las partículas observadas alrededor y dentro de las vacuolas. Recientemente (8) el desarrollo del virus de la EEV ha sido estudiado en células cultivadas, demostrándose la maduración de los virus en la membrana externa de las células y en la membrana de las vacuolas citoplasmáticas.

Estudios con el virus Semliki Forest (2, 16), han demostrado con claridad la manera como las partículas precursoras de ese arbovirus del grupo A, adquieren la envoltura a nivel de la membrana plasmática y salen al exterior de la célula por un mecanismo semejante a la gemación; aunque se describen ocasionalmente partículas virales maduras dentro de las vacuolas citoplasmáticas, no se pudo observar la penetración de los precursores del virus al interior de las vacuolas. Estudios más detallados sobre el desarrollo del virus Semliki Forest, han aclarado más, el oscuro problema de la formación de las partículas virales en los arbovirus. En la referente a la penetración de las partículas virales en el interior de las vacuolas Erlandson (16) hace las mismas observaciones señaladas por Morgan y colaboradores, indicando que si bien las partículas del virus Semliki Forest parecen cruzar la membrana y al hacerlo incorporan una cubierta periférica, éste debe ser un proceso muy rápido, si es que en realidad existe, ya que se ven escasas formas de transición. En este estudio (16), también se propone la hipótesis del desarrollo de

las partículas virales maduras en el interior de las vacuolas, sin contacto con la membrana periférica; esta idea contrasta con la constante ausencia de partículas precursoras en la luz de las vacuolas citoplasmáticas.

Posteriormente, Grimley (32) estudia exhaustivamente la formación de vacuolas en células de embrión de pollo infectadas con SFV y propone diferenciarlas en dos grupos: Vacuolas citopáticas tipo I y tipo II. Al discutir las alteraciones de las células nerviosas nos referimos al origen y al significado de las vacuolas citopáticas tipo I. Sobre el mecanismo de penetración de las partículas virales en las vacuolas tipo II, Grimley (32) afirma, que los virus adquieren su envoltura en tránsito hacia la luz de las vacuolas, y considera que éstas se originan en las cisternas del retículo endoplasmático. Esta hipótesis, relacionando el retículo endoplasmático con las vacuolas que contienen partículas virales, ha sido propuesta para otros arbovirus (6, 7, 23, 42, 68). También Morgan (49), al estudiar el desarrollo del virus de la EEO en células cultivadas, consideró la posibilidad de que las vacuolas se originaran del retículo endoplasmático, pero rechazó ésta como una hipótesis poco probable. Recientemente Lascano y col (40), han mostrado por primera vez partículas de un arbovirus del grupo A, en las cisternas del retículo endoplasmático. Estudio con el microscopio electrónico sobre el desarrollo del virus Chikungunya (33), el cual pertenece al grupo A de los arbovirus, han mostrado semejan-

zas entre la parte central de las partículas virales maduras y las partículas precursoras, demostrando el proceso de ensamblaje de las partículas virales en la superficie celular por medio de anticuerpos marcados con ferritina. En lo referente a la penetración de los precursores del virus Chikungunya a través de las membranas de las vacuolas, no se observó ninguna imagen de gemación, pero se supone que ésta debe ocurrir de una manera similar a la propuesta por Morgan para el virus de la EEO.

Algunos estudios sobre el desarrollo del virus de la fiebre amarilla (6, 7) han demostrado partículas virales en cisternas del retículo endoplasmático y en el citoplasma celular; no obstante la clara visualización de los virus, no se identificaron partículas precursoras, siendo este detalle común a los arbovirus del grupo B. Igualmente, en la infección con virus de la encefalitis japonesa (82) no se han observado partículas precursoras, a pesar de ser los hallazgos ultraestructurales similares a los reportados por Morgan (49) para el virus de la EEO, proponiéndose también un mecanismo de pinocitosis invertida para explicar la liberación de los virus. Una excepción entre los arbovirus del grupo B, parece ser el virus Powassan (1), transmitido por la picadura de garrapatas, y en cuya infección se han descrito partículas similares en tamaño a los llamados precursores virales.

Al resumir las hipótesis que se han propuesto sobre el desarrollo de

las partículas virales en los arbovirus, observamos que la mayoría de los estudios con el M.E. sugieren que las partículas precursoras de los arbovirus del grupo A adquieren una cubierta y se transforman en partículas virales maduras cuando penetran en la luz de las vacuolas citoplasmáticas. El origen de las vacuolas citoplasmáticas y su significado en relación con la replicación viral son oscuros; si bien algunos autores sugieren la participación del retículo endoplasmático en su formación, esta relación es más aparente en las infecciones con arbovirus del grupo B.

Núñez Montiel (57) llamó la atención sobre el desarrollo del complejo de Golgi en las células infectadas con el virus de la EEV, señalando que este sistema de membranas y cisternas posiblemente estaba relacionado con la formación de las vacuolas y con la replicación de los virus. Lascano (42), estudiando otro arbovirus del grupo A, concluye en base a sus observaciones con el M.E., que las membranas del aparato de Golgi deben participar en el ensamblaje del virus Aura, y hace hincapié en que todavía no existe una clara demostración del proceso de ensamblaje de las partículas virales en el interior de las células. Nuestros hallazgos confirman la hipótesis de Lascano, y muestran en detalle las diferentes etapas de la penetración viral, tanto en las vacuolas citoplasmáticas, como en las cisternas proliferadas del complejo de Golgi.

Los resultados obtenidos inoculando intracerebralmente ratones recién nacidos con el virus de la EEV, sugieren que en el citoplasma de las células nerviosas comienzan a aparecer masas de material retículo-granular, generalmente en la vecindad del complejo de Golgi, y alrededor de ellas se van a formar las partículas precursoras, para migrar hacia las membranas del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, adquiriendo una cubierta al penetrar al interior de las cisternas o vesículas citoplasmáticas, o al salir de la célula atravesando la membrana plasmática. Esta secuencia coincide en parte con las observaciones hechas por Morgan (49) sobre el desarrollo del virus de la EEO, en células cultivadas; sin embargo, difiere considerablemente del concepto que sobre el desarrollo del virus de la EEV, se ha sostenido hasta el presente (52). Hemos descrito partículas con el aspecto de estructuras redondas y osmiofilicas, en ocasiones con un centro más lúcido, que miden entre 28 y 35 milimicras, las cuales se disponen aisladas o en grupos, y ocasionalmente formando conglomerados de apariencia cristalina, pero con mayor frecuencia estas partículas se vieron adheridas a las membranas del retículo endoplasmático y a las cisternas y vesículas del complejo de Golgi. Estructuras de forma y tamaño similares se han considerado como nucleocápsidos precursores en la formación de las partículas virales maduras en diferentes tipos de arbovirus del grupo A (2, 33, 42, 49, 52).

Hemos descrito también, masas reticulogranulares, con aspecto similar a la cromatina nuclear o a las formaciones granulares inducidas por la puromicina en el citoplasma de las células nerviosas de ratones (24) y en las células de los acinos pancreáticos de ratas (44). Las masas granulares, descritas en el citoplasma de los ratones inoculados con el virus de la EEV, se vieron con frecuencia rodeadas por partículas precursoras; podríamos considerar aceptable la denominación de viroplasma si suponemos que este material granular es proteína viral, y dicha suposición se basaría en el parecido entre las masas granulares y la cromatina nuclear y en el hecho de que con frecuencia las partículas precursoras parecen nacer por condensación del material granular. Hallazgos similares han sido recientemente reportados en células de embrión de pollo infectadas con el virus de la EEV (8).

Estudios en células cultivadas de embrión de pollo infectadas con el virus Semliki Forest (20) han sugerido, que tanto la proteína viral como el ácido ribonucleico, se forman en las membranas de esas células. En un trabajo más reciente, Grimley y col (32) sugieren, que la membrana plasmática puede ser también el sitio donde se efectúa la síntesis de proteína viral, y proponen que las primeras etapas en la síntesis del virus SF, se cumplen en vacuolas citoplasmáticas. Si tomamos como base estos estudios, las masas de viroplasma y de partículas precursoras descritas por Bykovsky

(8) y por nosotros, deben corresponder a áreas de almacenamiento de partículas virales que han penetrado en las células y que se hacen visibles inmediatamente después de la fase de eclipse; de manera que la maduración de las partículas virales se podría efectuar a nivel de la membrana celular o en algunas vacuolas cuando los nucleoides incorporan la envoltura. Sin embargo, nosotros consideramos muy probable que los nucleoides que constituyen las partículas precursoras del virus de la EEV, estén formados por ARN y proteína viral y que tanto la proteína como el ARN del virus de la EEV, podrían ser fabricados de las masas de viroplasma descritas. Debe también plantearse la posibilidad de que las masas de viroplasma representen grandes agrupaciones de ribosomas, proteínas celulares y partículas precursoras en un estado tardío de la infección celular. Aunque no puede subestimarse el hecho de que las células con mayor cantidad de virus y focos de viroplasma mostraron dispersión y disminución de los polirribosomas, consideramos poco probable que las masas reticulogranulares representen un estadio tardío; especialmente por presentar estas áreas de viroplasma, aspecto en ocasiones incipiente, sin partículas precursoras, en el citoplasma de las células nerviosas de los ratones sacrificados 16 horas después de la inoculación.

Hemos propuesto que las partículas precursoras pueden formarse en condensaciones de ácido ribonucleico y de proteína formadas bajo el

control viral, en el citoplasma de las células nerviosas y esta hipótesis se apoya en parte en los estudios recientemente reportados sobre el desarrollo del virus Chikungunya, utilizando la técnica de autorradiografía, los cuales demostraron la presencia de ARN viral en masas de viroplasma observadas en el citoplasma celular (34). Por otra parte, es notorio el parecido existente entre el viroplasma asociado a partículas virales en la EEV y las inclusiones citoplasmáticas e intranucleares observadas en las infecciones provocadas por el virus de inclusión citomegálico (46), herpes simple (García-Tamayo J. Resultados presentados en la XIV Jornadas de la Sociedad Venezolana de Anatomía Patológica. Maracay, Venezuela, 1968); y las inclusiones citoplasmáticas producidas en las neuronas de ratones (37), zorros (14), perros y humanos por el virus de la rabia (García-Tamayo J. Resultados presentados en el VII Congreso Latinoamericano de Patología y II Congreso Panamericano de la Academia Internacional de Patología. Buenos Aires, 1969).

Recientemente se han reportado partículas virales alrededor de masas granulares y osmiofilicas, en el citoplasma de células infectadas con el virus de la fiebre de las garrapatas del Colorado, y del virus Chenunda (51). Esta localización citoplasmática de las partículas precursora, rodeando masas de material similar a la cromatina, habían sido descritas por Southan en células cultivadas infectadas con el virus West Nile y Guaroa (68), y reciente-

mente se ha demostrado en el cerebro de ratones y en células cultivadas infectadas con el virus Aura, clasificado en el grupo A de los arbovirus (42), y en células cultivadas de embrión de pollo infectadas con el virus ae la EEV (8). Exceptuando los trabajos que mencionamos, no conocemos otras publicaciones en las que se describen masas de viroplasma en relación con partículas precursoras en los arbovirus del grupo A o B.

Los estudios realizados en cerebro de ratón y en células de embrión de pollo infectadas con virus Aura, demostraron la presencia de formaciones tubulares dentro de las masas de material electrondenso; en estos rubos parecen originarse las partículas virales precursoras (Lascano, E. Comunicación personal). Hallazgos similares han sido reportados por Bykovsky en la infección con virus de EEV (8). Formaciones tubulares similares a las descritas en la infección de los virus Aura y EEV han sido reportadas en las vacuolas citoplasmáticas de células HEp2 (16) y células de embrión de pollo (2) inoculadas con el virus Semliki Forest; sin embargo, estas estructuras no han sido descritas en asociación con masas de viroplasma. Nosotros hemos tenido la oportunidad de observar estructuras tubulares de apariencia muy similar a las descritas anteriormente, ubicadas en el citoplasma y algunas veces en masas de material granular con aspecto de viroplasma, en el cerebro de ratones recién nacidos inoculados con una suspensión de virus

Nariva (Walder R. y García-Tamayo J. Resultados no publicados).

Estructuras tubulares semejantes a las reportadas han sido descritas en células infectadas con virus polio (83), herpes (62) y del sarampión (79), no conociéndose su origen ni sus funciones, aunque se cree que están relacionadas con el proceso de ensamblaje de las partículas virales. Todos estos resultados contribuyen a destacar la relación que parece existir entre las partículas precursoras y las áreas de viroplasma encontradas en el citoplasma de células infectadas con arbovirus del grupo A.

Si bien es cierto que los hallazgos descritos van a afianzar la teoría propuesta sobre el desarrollo de los precursores del virus de la EEV en masas de viroplasma, es preciso que revisemos brevemente algunos estudios sobre la replicación del ARN viral para poder interpretar mejor el significado de los llamados precursores virales y sobre todo para comprender mejor la relación que puede existir entre los nucleocápsidos, la alteración de los sistemas celulares y el proceso mismo del ensamblaje y de la síntesis del virus de la EEV.

En los virus que contienen ARN se ha estudiado la organización molecular del ácido nucleico, determinándose la existencia de tres tipos diferentes (30): ARN de cadena simple, ARN de cadena doble y un tercer tipo el cual ha sido descrito en virus pequeños como polio (17), Semliki Forest (20) y el virus de la encefalitis equina del Oeste (70). Estos estudios han progresado gracias a inves-

tigaciones recientes realizadas con bacteriófagos utilizando isótopos radioactivos, con los cuales se ha demostrado la existencia de un precursor de ARN de cadena simple, el cual se ha denominado "replicative intermediate" (R-I) (43). Se ha propuesto que este tercer tipo de molécula de ARN consiste en un núcleo de cadena doble al cual están adheridas "colas" de cadena simple (30b). Estudios con el microscopio electrónico y por sedimentación han aislado el ARN de cadena simple que sedimenta más rápido y posee propiedades infectantes, el R-I con cadena doble y "colas" considerado como una forma precursora del ARN infectante, y la forma de ARN que sedimenta más lentamente, o sea el de cadena doble (31).

Entre los arbovirus del grupo A, se ha estudiado la replicación del ARN del virus Semliki Forest en fibroblastos de pollo marcados con uridina H3 y utilizando técnicas de centrifugación y fraccionamiento, se ha tratado de determinar la localización citoplasmática de los diversos tipos de ARN (20). Estos estudios han demostrado partículas 140-S, resistentes a la acción de la ribonucleasa, que, además de proteína, contienen ARN viral (Unidad 40-S), pero sin poseer propiedades infecciosas, teniendo por consiguiente, gran similitud con las llamadas partículas precursoras. En otras fracciones de ARN aisladas se identificó una forma 20-S, la cual difería considerablemente de las otras dos fracciones de ARN aisladas (42-S y 26-S). La forma 20-S es la primera

en ser marcada por el isótopo en el proceso de síntesis viral y posiblemente corresponde al llamado "replicative intermediate", postulándose que el ARN viral debe inicialmente sintetizarse sobre las estructuras de las unidades aisladas en la forma 20-S (20). En estudios recientes de centrifugación diferencial se ha determinado que el R-I del virus SF, se puede aislar de los polirribosomas que están produciendo proteína viral (21) y de las membranas (22). Estos hallazgos corroboran la hipótesis propuesta para explicar los primeros estadios en la formación de las partículas virales en las vacuolas citoplasmáticas CPV I (20, 32). En presencia de un inhibidor de la síntesis proteica viral, la cycloheximide, se provoca un aumento momentáneo del ARN viral como consecuencia de la incapacidad del virus para formar partículas precursoras, por lo cual, las vacuolas CPV-II rodeadas de partículas virales, no se producen (23). El hecho comprobado de que la unidad 14O-S que contiene ARN perteneciente a la fracción 4O-S, corresponde a las estructuras conocidas como partículas precursoras en las células infectadas con el virus Semliki Forest (20, 22, 23), al igual que la reciente demostración de ARN en las partículas del virus de la EEO (69), contribuye a reforzar nuestra hipótesis de que las partículas precursoras del virus de la EEV deben contener ARN viral.

Nosotros hemos considerado probable que los precursores virales se originen en masas reticulogranulares de viroplasma; esta teoría pare-

ce no concordar con los hallazgos de Friedman (20, 21, 22) en lo que se refiere a la localización del R-I del ARN en las membranas celulares en la etapa inicial de la replicación del virus Semliki Forest; sin embargo, existen apreciables diferencias desde el punto de vista ultraestructural entre las células cultivadas utilizadas en los estudios de Friedman (20, 21, 22), Grimley (32), Acheson y Tamm (2), y otros autores que han investigado el desarrollo del virus Semliki Forest (73), y las células del tejido nervioso de ratones recién nacidos utilizadas en nuestro experimento con virus de EEV. La ausencia casi total de vacuolas CPV I en las células nerviosas, la presencia de masas de viroplasma rodeadas por partículas precursoras, y la participación de las citomembranas del aparato de Golgi en el ensamblaje de la cápsula de los precursores del virus, son algunos de los aspectos más resaltantes de nuestros hallazgos, los cuales difieren básicamente de las observaciones realizadas en células cultivadas infectadas con SFV (2, 16, 32), y en general plantean interrogantes desde el punto de vista ultraestructural, para otras infecciones producidas por arbovirus.

Hemos señalado el hecho de que recientemente se han reportado masas de viroplasma en el citoplasma de células infectadas con el virus de la fiebre de las garrapatas del Colorado, el virus Chenuda (51), Chikungunya (33) y Aura (42); comparando estos estudios con nuestras observaciones con el microscopio electrónico en el tejido nervioso de

ratones inoculados con el virus de la EEV, notamos gran similitud entre las células nerviosas de los ratones inoculados con el virus Aura (42) y con el virus de la EEV. Igualmente lo observado con el M.E. en otros tejidos fuera del sistema nervioso de nuestros ratones inoculados con el virus de la EEV (García-Tamayo J. Resultados no publicados), son similares a las alteraciones ultraestructurales sistemáticas observadas por Lascano y col (42) en la infección con el virus Aura (Lascano E.F. Comunicación personal). Estos estudios y nuestros resultados, parecen indicar que la secuencia inicial propuesta para explicar el desarrollo del virus de la EEV es correcta, y probablemente existe en los tejidos de animales infectados con otros arbovirus del grupo A.

La formación de las partículas virales maduras se completaría a nivel de las membranas celulares, con la incorporación por parte de los virus, de sus proteínas con algunos antígenos específicos (33) localizadas a nivel de las membranas celulares y las cuales se visualizan con el M.E. presentando proyecciones pequeñas en la superficie de las partículas virales (65, 66). La liberación de las partículas virales también se puede explicar interpretando en las microfotografías electrónicas las secuencias ultraestructurales reportadas. Pudimos apreciar gemación en la superficie de la membrana celular y en las citomembranas, con incorporación por parte de las partículas precursoras, de la unidad de membrana, saliendo al espacio in-

tersticial. Este fenómeno ha sido demostrado en otros arbovirus del grupo A (2, 33, 49). Algunas partículas virales parecen abandonar las células, cuando éstas se encuentran muy alteradas, por ruptura de las estructuras intracelulares y disociación del citoplasma y de la membrana plasmática; otras células mostraron ocasionalmente, vacuolas conteniendo partículas virales las cuales parecían salir de las células por ruptura de la pared de las vacuolas. Este mecanismo de liberación de los virus es semejante a una pinocitosis invertida y ha sido propuesta por Morgan en la infección con virus de la EEO (49).

En lo concerniente al tamaño y a la forma de las partículas del virus de la EEV, nuestros hallazgos coinciden con las descripciones previas de las partículas precursoras y maduras del virus de la EEV (8, 52, 53).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ABDELWAHAB K. S., ALMEIDA J. D., DOANA F. W., McLEAND M.: Powasan virus: Morphology and cytopathology. *Can Med Ass J* 90:1068-1072, 1964.
- 2- ACHESON N., TAMMI I.: Replication of Semliki Forest Virus: An electron microscopic study. *Virology* 32:128-143, 1967.
- 3- ALLISON A. C., MALLUCCI L.: Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus infected cell cultures. *J Exp Med* 121:463-477, 1965.

- 4- AVILAN-ROVIRA J.: El brote de encefalitis equina venezolana al norte del Estado Zulia a fines de 1962. *Rev Ven San Asist Soc* 29(3):231-321, 1964.
- 5- BARKA T., ANDERSON P. J.: *Histochemistry: Theory, practice and bibliography*. Hoeber Med Div. Harper & Row Publ Chap 9. Págs 238-242, 1963.
- 6- BARUCH E.: Electron microscopic study of spinal cord of mice infected with yellow fever virus. *J Ultr Res* 9:209-224, 1963.
- 7- BERGOLD G. H., WEIBEL J.: Demonstration of yellow fever virus with electron microscope. *Virology* 17:554-562, 1962.
- 8- BYKOVSKY A. F., YERSHOV F. I., ZHDANOV V. M.: Morphogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Virol* 4:469-504, 1969.
- 9- CASTILLO C. E.: Informe sobre una reciente epidemia de encefalitis equina venezolana en la zona norte del Estado Zulia. *Rev Ven San Asist Soc* 29(3):325-353, 1964.
- 10- DALGRANO L., COS R. A., MARTIN E. M.: Poliribosomes in normal Krebs 2 ascitis tumor cells infected with encephalomyocarditis virus. *Bioch Biophys Acta* 138:316-328, 1967.
- 11- De DUVE C.: *The lysosome concept*. Ciba Foundation Symposium on Lysosomes Edit de Reuck A.V.S. & Cameron M P Little Brown & Co Boston, 1963.
- 12- De DUVE C.: From cytases to lysosomes. *Fed Proc* 23: 1045-1049, 1963.
- 13- DEROBERTIS E. D. P., NOWINSKY W. W., SAEZ F. A.: *Biología Celular*. 6ta Edición, Edit El Ateneo Buenos Aires Cap. 17 Págs 412, 1965.
- 14- DIERKS R. E., MURPHY F. A., HARRISON A. K.: Extraneural rabies virus infection. *Amer J Path* 54:251-274, 1969.
- 15- DINMAN B. D.: Mechanism of disease. *Pathologic Physiology Sodeman & Sodeman 4th edi W. B. Saunders Co (Edit) Chap 15 Págs 264-274, 1967.*
- 16- ERLANDSON R. A., BABCOCK V. I., SOUTHAN C. M., BAILEY R. B., SHIPKEY F. H.: Semliki Forest Virus in HEP2 cell cultures. *J Virol* 1(5):996-1009, 1967.
- 17- FENICK M. L.: The influence of poliovirus infection on RNA synthesis in mammalian cells. *Virology* 19:241-249, 1963.
- 18- FOSSAERT H.: Investigación de casos humanos de encefalitis equina venezolana. *Diagnóstico de laboratorio*. *Rev Ven San Asist Soc* 31(Suplem 3):845-852, 1966.
- 19- FRANKLIN R. M., BALTIMORE D.: Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus infected mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol* 27:137-198, 1962.
- 20- FRIEDMAN R. M., BERESSEKI I. K.: Cytoplasmic fraction associated with Semliki Forest Virus ribonucleic acid replication. *J Virol* 1:374-383, 1967.
- 21- FRIEDMAN R. M.: Protein synthesis directed by an arbovirus. *J Virol* 6:26-32, 1968.

- 22- FRIEDMAN R. M.: Replicative intermediate of an arbovirus. *J Virol* 6:547-552, 1968.
- 23- FRIEDMAN R. M., GRIMLEY P. M.: Inhibition of arbovirus assembly by Cyclohexamide. *J Virol* 3:292-299, 1969.
- 24- GAMBETTI P., GONATAS N. K., FLEXNER L. B.: The fine structure of Puromycin-induced changes in mice entorhinal cortex. *J Cell Biol* 36:379-390, 1968.
- 25- GARCIA-TAMAYO J., VALDIVIA E.: Acid phosphatase activity in the granular pneumocyte. *Amer J Pathol* 50(6): 47a, 1967.
- 26- GILYARD R. T.: A clinical study of Venezuelan virus equine encephalomyelitis in Trinidad B. W. I. *J Amer Vet Med Assc* 106:267, 1945.
- 27- 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 Inf Dis* 110:80-97, 1962.
- 28- GONATAS N. K., GOLDENSHONE S.: Unusual neocortical presynaptic terminals in a patient with convulsion, mental retardation and cortical blindness: An electron microscopic study. *J Neuropathol Exper Neurol* 24:539-562, 1965.
- 29- GONATAS N. K., ANDERSON W., EVANGELISTA I.: The contribution of altered synapsis in senile plaque: An electron microscopic study in Alzheimer's dementia. *J Neuropathol Exper Neurol* 25:25-39, 1966.
- 30- GODHEART C. R.: An introduction to Virology. W.B. Saunders Co (Edit) Chap 11 a) Págs 199-266 b) Págs 208-215, 1969.
- 31- GRAMBOULAN N., FRANKLIN R. M.: Replication of bacteriophage ribonucleic acid; analysis of the ultrastructure of the replicative form and the replicative intermediate of bacteriophage R 17. *J Virol* 2:129-148, 1968.
- 32- GRIMLEY P. H., BERESSESKY I. K., FRIEDMAN R. M.: Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection. Locci of viral ribonucleic acid synthesis. *J Virol* 2:1326-1338, 1968.
- 33- HIGASHI N., MATSUMOTO A., TABATA K., NAGAMOTO Y.: Electron microscopic study of development of Chikungunya virus in green monkey stable (VERO) cells. *Virology* 33:55-69, 1967.
- 34- HIGASHI H.: Virology I. Proceedings of the first International Congress for Virology J.L. Melnick, editor Basel Pag 49, 1969.
- 35- HOWE C., MORGAN C., De VAUX ST., CYR C., HSUK C., ROSE H. M.: Morphogenesis of type 2 parainfluenza virus examined by light and electron microscopy. *J Virol* 1:215-237, 1967.
- 36- JENSE W. A.: Cotton embryogenesis. *J Cell Biol* 36:403-406, 1968.
- 37- JENSON B. A., ROBIN E. R., WENDE R. D., MELNICK J. L.: A comparative light and electron microscopic study of rabies and Hart Park virus encephalitis. *Exper Mol Pathol* 7:1-10, 1967.
- 38- JOHNSON R. T.: Virus invasion of the central nervous system. *Amer J Pathol* 46:929-943, 1965.

- 39- KISSLING R. E., CHAMBERLAIN R. W., NELSON D. B., STAMM D. D.: Venezuelan equine encephalomyelitis in horses. *Amer J Hyg* 63:274-287, 1956.
- 40- KLUG A., CASPAR D. L. D.: The structure of small viruses. *Adv Virus Res* 7:225-325, 1960.
- 41- KUBES V., RIOS V. A.: The causative agent of equine encephalomyelitis in Venezuelan. *Science* 90:20, 1969.
- 42- LASCANO E. F., BERRIA M. I., BARRERA-ORO J. G.: Morphogenesis of Aura virus. *J. Virol* 4:271-282, 1969.
- 43- LODISH H. F., ZINDER N. J.: Replication of the RNA bacteriophage ϕ 2. *Science* 152:372-377, 1966.
- 44- LONGNECKER D. S., SHINOSUKA H., FARBER E.: Molecular pathology of in vivo inhibition of protein synthesis. *Amer J Path* 52:891-915, 1968.
- 45- MALLUCCI L., ALLISON A. C.: Lysosomal enzymes in cells infected with cytopathic and non-cytopathic viruses. *J Exp Med* 121:477-485, 1965.
- 46- MARTIN A. M., KURTZ S. M.: Cytomegalic inclusion disease. *Arch Path* 82:27-34, 1966.
- 47- MAXWELL D. S., KRUGER L.: The fine structure of astrocytes in the cerebral cortex and their response to focal injury produced by heavy ionizing particles. *J Cell Biol* 25:141-157, 1965.
- 48- MONNERON A.: Experimental induction of helical polysomes in adult rat liver. *Lab Invest* 20:178-183, 1969.
- 49- MORGAN C., HOWE C., ROSE H. M.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Western equine encephalomyelitis virus. *J Exper Med* 113:219-234, 1961.
- 50- MOSSOWOSKY M. J., LONG D. M., MYERS R. E., DE CURT H. R., KIATZO I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J Neuropath Exper Neural* 27:500-576, 1968.
- 51- MURPHY F. H., COLEMAN P. H., HARRISON A. K., GARY G. W.: Colorado tick fever virus: An electron microscopic study. *Virology* 35:28-40, 1968.
- 52- MUSSGAY M., WEIBEL J.: Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan equine encephalitis virus in KB cells. *Virology* 16:52-62, 1962.
- 53- MUSSGAY M., WEIBEL J.: Electron microscopic demonstration of purified Venezuelan equine encephalitis virus. *Virology* 19:109-112, 1963.
- 54- NEGRETTE A.: Encefalitis epidémica. *Invest Clín N* 1:12-34, 1960.
- 55- NEGRETTE A.: Encefalitis equina venezolana. Leucocitos vacuolados. *Invest Clín N* 26:97-107, 1968.
- 56- NOVIKOFF A. B., ESSNER E., QUINTANA N.: Golgi apparatus and lysosomes. *Fed Proc* 23(II):1010-1022, 1964.
- 57- NUÑEZ-MONTIEL O., MUSSGAY M., WEIBEL J.: Citopatología de la infección con Reovirus y virus de la EEV en las células cultivadas. *Rev Latinoamer Anat Patol* 6:1-17, 1962.
- 58- OKSCHE A.: Der histochemisch nachweisbare Glycogenaufbau und -abbau in den Astrocyten und Epen-

- dymzellen als Beispiel einer Funktions - abhängigen Stoffwechsellaktivitat der Neuroglia. *Z Zellforsh* 54:307-319, 1969.
- 59- OTA Z.: Electron microscope study of the development of Japanese B encephalitis virus in porcine kidney stable (P.S) cells. *Virology* 25:372-378, 1965.
- 60- PRIER J. E.: Basic Medical Virology. The Williams & Wilkins Co Baltimore Chp 13. Págs 355-365, 1966.
- 61- RAMSEY H. J.: Altered synaptic terminals in cortex near tumors. *Amer J Path* 51:1093-1109, 1967.
- 62- ROBIN E. R., JENSON A. B., PHILIPS C. A., MELNICK J. L.: Herpes simplex virus hepatitis in mice. An electron microscopic study. *Exper Mol Path* 8:34-48, 1968.
- 63- SAN MARTIN-BARBERI C., GROOT H., OSORNO-MESA E.: Human epidemic in Colombia caused by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 3:283-293, 1954.
- 64- SHIMIZU M., HAMURO Y.: Deposition of glycogen and changes in some enzymes in brain wounds. *Nature* 4:747-748, 1968.
- 65- SIMPSON R. W., HAUSER R. E.: Basic structure of group A arbovirus strains Middelburg, Sindbis and Semliki Forest examined by negative staining. *Virology* 34:358-361, 1968.
- 66- SIMPSON R. W., HAUSER R. E.: Structural differences of group A arbovirus based on nucleoid morphology in ultrathin sections. *Virology* 34:568-570, 1968.
- 67- SMITH D. T., CONNAT N. F., OVERMAN J. R.: *Zinserr Microbiology*. 13th Edit Appleton Century Crofts Div Meredith Pub Co New York Chap 62 Págs 881-895, 1964.
- 68- SOUTHAN C. M., SHIPKEY F. H., BABOCK B.I., BAILEY R. B., ERLANDSON R. A.: *Virus biographies I. Growth of West Nile and Guaroa viruses in tissue culture*. *J Bacteriol* 88:187-199, 1964.
- 69- SREEVALSANT., ALLEN P. T.: Replication of Western equine encephalomyelitis virus II. Cytoplasmic structure involved in the synthesis of the virions. *J Virol* 2:1038-1046, 1966.
- 70- SREEVALSANT., LOCKART Jr. R. Z.: Heterogeneous RNA's occurring during the replication of Western equine encephalomyelitis virus. *Procc Nat Acad Scie* 55:974-981, 1966.
- 71- SUZUKI I., KAMEL H., TAKASANI M.: Ultrastructural study on the ribosome helix and its change after antigenic stimulation in PJ3 cells. *Exp Mol Path* 11:28-37, 1969.
- 72- TASKER J. B., MIESSE M. L., BERGE T. O.: Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis III. Distribution in tissue of experimentally infected mice. *Amer J Trop Med Hyg* 11:844-850, 1962.
- 73- TAYLOR J.: Studies on the mechanism of action of Interferon. Interferon action and RNA synthesis in chick embryo fibroblasts infected with Semliki Forest Virus. *Virology* 25:340-349, 1965.
- 74- VAN-LANOKER J. L.: Concluding Remarks. *Fed Proc* 23:1050- 1052, 1964.

-
- 75- VALDIVIA E., SONNAD J.: Fatty change of the granular pneumocyte in CCl₄intoxication. Arch Path 81:514-519, 1966.
- 76- VALVIDIA E., GARCIA-TAMAYO J.: Pulmonary alterations in experimental chronic hypoxia. Amer J Path Scien Procc 1968.
- 77- VALVIDIA E., BOFFMAN R. L., GARCIA-TAMAYO J.: Alveolar wall alterations in acute ethinine intoxications. Fed Procc 27(2):250, 1968.
- 78- VICTOR J., SMITH D. C., POLLACK A.D.: The comparative pathology of Venezuelan equine encephalomyelitis. J Inf Dis 98:55-56, 1956.
- 79- WEAR E. J., RABIN E. R., RICHARDSON L. S., BAPPF.: Virus replication and ultrastructural changes after induction of encephalitis in mice by measles virus. Exp Mol Path 9:405-417, 1968.
- 80- WENGER F., MOLERO L., FERREIRA H., NEGRETTE A.: Encefalitis equina venezolana. Invest Clín N° 5:69-86, 1963.
- 81- WENGER F.: Hallazgos de anatomía patológica en la reciente epidemia de encefalitis equina venezolana. Invest Clín N°7:23- 45, 1963.
- 82- YASUSUMI C., TSUBO I.: Analysis of the development of Japanese B Encephalitis virus II. Electron microscopic studies of neurons infected with JBE virus. J Ultrast Res 12:314-316, 1965.
- 83- ZU-RHEIN G. M., CHOU S. A.: Papova virus in progressive multifocal leucoencephalopathy. Infections of the nervous system Res Publ of Asoc for Res in Nervous and Mental Diseases Vol 44:307-362, 1968.