

Alteraciones iniciales inducidas en los vasos placentarios de la rata por el virus de la Encefalitis equina Venezolana.

*Jorge García-Tamayo**, *Saudy E. de García** y *José Esparza***.

*Instituto Anatomopatológico, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado 50647, Correo de Sabana Grande, Caracas, Venezuela, **Centro de Microbiología, Laboratorio de Virus Animales, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado Postal 1827, Caracas, Venezuela.

Resumen. Los virus de la rubéola y de la EEV pertenecen ambos a la familia Togaviridae. Las alteraciones iniciales en los vasos placentarios durante la infección con el virus de la EEV fueron examinados por métodos virológicos, histológicos e inmunohistoquímicos. Se vieron células citotrofoblásticas que reemplazan a las células endoteliales y mostraban signos de inflamación y evidencia inmunohistoquímica de antígenos del virus de la EEV en ellas y en las células deciduales perivasculares. La comparación de los hallazgos virológicos y morfológicos en la infección placentaria con el virus de la EEV en la rata y el mecanismo patogénico propuesto para explicar el daño intrauterino inducido en los seres humanos por el virus de la rubéola, demuestra grandes similitudes. Se propone una cuidadosa evaluación del papel del virus de la EEV como causa de malformaciones congénitas en las áreas endémicas de esta infección en Venezuela.

Initial alterations induced by Venezuelan equine encephalitis virus infection in rat placental vessels.

Invest Clin 24(1): 3-15, 1983.

Abstract. Rubella and VEE virus both belong to Togaviridae family. Initial alterations of placental vessels during VEE virus infection were examined by virologic, histologic and immunohistochemical methods. Citotrophoblastic cells were replacing endothelial cells and showed inflammatory changes and immunohistochemical evidences of VEE virus antigens were also in the perivascular decidual cells. Comparison of virologic and morphologic changes in the placenta during VEE virus infection in the rat and pathogenic mechanism proposed to explain the intrauterine damage by

rubella virus in humans show striking similarities. A careful evaluation of the role of VEE virus as the cause of congenital malformations in the endemic areas of this infection in Venezuela is proposed.

INTRODUCCION

El virus de la encefalitis equina venezolana (EEV) y el de la rubéola pertenecen a la familia Togaviridae (14). Ambos virus poseen un nucleocápsido formado por ácido ribonucleico y proteínas dispuestas con un arreglo similar, así como una envoltura glicolipídica aún no muy bien caracterizada; tanto el virus de la EEV como el de la rubéola son capaces de atravesar la barrera placentaria y provocar infecciones en los seres humanos (1, 19) y en los animales (2, 12, 21). La principal diferencia entre ambos virus consiste en que uno de ellos (EEV) es transmitido por artrópodos y pertenece al género *Alfavirus* y el otro (rubéola) no tiene un vector intermediario y es el único miembro del género *Rubivirus* (14).

La patogenia de la infección intrauterina provocada por los *Alfavirus* y *Rubivirus* parece ser similar (13, 17, 22); sin embargo se sabe poco sobre las alteraciones placentarias inducidas por el virus de la EEV (12, 13). Recientemente estudios realizados en nuestro laboratorio han descrito trombosis de los vasos deciduales y necrosis placentaria en la infección con el virus de la EEV, similares a las demostradas en la placenta de humanos durante la infección con el virus de la rubéola; las lesiones en los fetos de las ratas inoculadas con el virus de la

EEV se consideraron secundarias a las alteraciones vasculares de la placenta (12, 13).

El objeto de este trabajo es examinar por métodos virológicos, histológicos e inmunohistoquímicos, la patogenia de las lesiones iniciales en los vasos placentarios de las ratas inoculadas con el virus de la EEV.

MATERIAL Y METODOS

Virus: Se utilizó la cepa Guajira del virus de la EEV IVIC PH 117S, de acuerdo con la metodología de pasajes y titulaciones descritas en trabajos previos (10, 11, 12, 13).

Animales: Veinte ratas hembras Sprague-Dawley de aproximadamente cien días de edad fueron inoculadas por vía intraperitoneal (IP) con 200 unidades formadoras de placas (UFP) del virus de la EEV a los 15, 16, 17 y 18 días de gestación. La fecha de inicio de la gestación se determinó por el estudio microscópico del medio vaginal, apareamiento de las ratas hembras durante el estro y posterior lectura microscópica del contenido de espermatozoides en el medio vaginal. Las ratas se sacrificaron uno, dos y tres días después de la inoculación cuando la edad gestacional oscilaba entre 18 y 20 días. Cinco ratas Sprague-Dawley con un período de gestación similar a las experimentales no fueron inoculadas y se sacrificaron de ma-

nera similar para ser utilizadas como controles sanos.

El material de sangre y tejidos para el estudio virológico fue tomado al momento de sacrificar los animales y se procesó de manera similar a la descrita en experimentos previamente reportados por nosotros (10, 13).

Histología: La fijación de las placentas y los fetos se hizo en formol al 10% tamponado en solución reguladora de fosfato de sodio a pH 7.2. El material se deshidrató en alcoholes a concentraciones crecientes y se incluyó en parafina. Cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina, PAS, tricrómico de Masson y reticulina de Wilder según métodos convencionales y se examinaron y fotografiaron en un microscopio de luz.

Inmunohistoquímica: El material incluido en parafina fue seccionado en cortes de seis micras de espesor, recogidos en láminas de vidrio y colocados en una estufa a 60°C durante una hora. Los cortes fueron deparafinados en xilol y en etanol a concentraciones decrecientes. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada por medio de la incubación de los cortes durante veinte minutos en una solución de metanol y peróxido de hidrógeno. Previo lavado con agua destilada los cortes se incubaron durante quince minutos en suero normal de cochino, y luego se colocaron en cajas de Petri, húmedas, a temperatura ambiente, cubiertas con anticuerpos, anti-EEV, de conejo preparado en el laboratorio de Virología

del IIC, usando los métodos convencionales de inmunización a diluciones de 1:100, 1:250, 1:500. Algunos cortes fueron cubiertos con solución tamponada de hidroximetil-amino-metano-salina (TRIS) para ser usados como control. Posteriormente todos los cortes fueron lavados con la solución TRIS y se incubaron en la solución del complejo peroxidasa-antiperoxidasa con una dilución de 1:100 durante 30 minutos. Los cortes lavados nuevamente con la solución tampón TRIS, fueron cubiertos con 0.06 tetrahidroclorido de diaminobenzidina diluido en 10 cc de TRIS con tres gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Los cortes se lavaron en agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina de Harris para ser montados en Permout.

RESULTADOS

Apariencia macroscópica: Las ratas sacrificadas uno, dos, tres y cuatro días después de la inoculación intraperitoneal con el virus de la EEV mostraron alteraciones variables en cuanto al aspecto macroscópico de los fetos y de las placentas. Un día después de la inoculación el aspecto de los fetos y placentas, no mostró diferencias con las de las ratas utilizadas como control, sin embargo se observó mayor congestión en la cabeza y en el área hepática. El segundo día de inoculación se observó una disminución del tamaño de casi todos los fetos comparados con fetos de ratas utilizados como control y sacrificadas en la misma edad gestacional. Algunos de



Fig. 1. Fetos y placentas a los 8 días de gestación, 3 días post-inoculación, todos de la misma madre. Se observa disminución del tamaño y cambios necrotizantes variables de un feto a otro.

estos fetos de menor tamaño eran muy pálidos y la placenta de cada uno de ellos mostraba al corte áreas de color blanco grisáceo. El tercer y cuarto día después de la inoculación estos cambios se acentuaron (Fig. 1). El tamaño y la apariencia general de los fetos varió entre algunos pequeños muy pálidos, blandos y friables y otros más grandes con áreas congestivas y hemorrágicas; el tamaño de estos fetos fue siempre menor del que deberían tener para la edad gestacional. En las placentas se vieron áreas hemorrágicas alternando con zonas de color blanco grisáceo.

Apariencia Microscópica: Histología.- Un día después de la inoculación los fetos mostraron congestión muy severa de todos los ór-

ganos sin lesiones tisulares aparentes. El segundo día después de la inoculación se observó marcada congestión del hígado y del sistema nervioso, con áreas hemorrágicas focales en los espacios de Virchow-Robin y en las meninges. La retina mostraba vacuolización de sus capas más profundas. Se vieron signos de edema en la sustancia gris del cerebro y hemorragias en la médula espinal. En los días tercero y cuarto después de la inoculación las diferencias entre los fetos producto de cada rata iban, desde los cambios descritos el segundo día hasta necrosis y hemorragias con aspecto de licuefacción en extensas áreas del cerebro y la médula espinal con alteración de la estructura del hígado y del bazo, cambios necróticos en los túbulos renales, congestión y he-

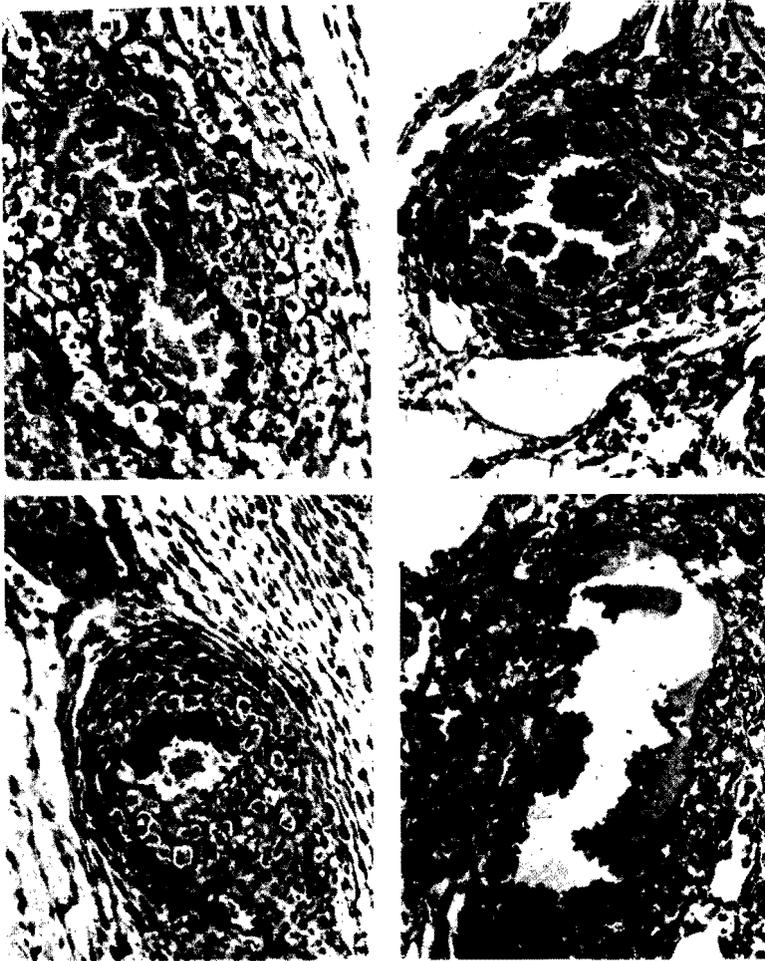
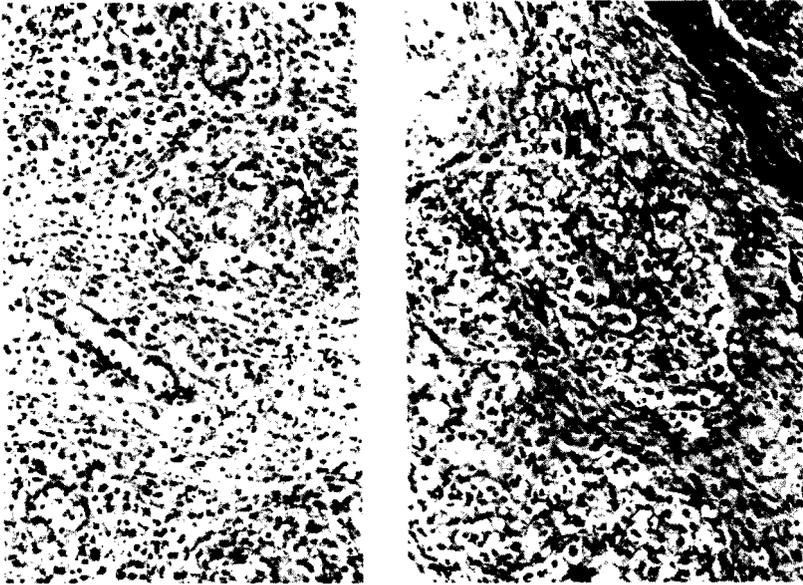


Fig. 2-5. Cambios inflamatorios iniciales durante el primer día después de la inoculación en los vasos de la zona de implantación de la placenta y del miometrio. Se ven células trofoblásticas que tapizan focalmente el endotelio, reacción decidua perivascular y algunos leucocitos polimorfonucleares infiltrando la pared vascular. Hematoxilina - eosina X 200 (Reducción tipográfica = 1/3).

morragias en el corazón y los pulmones.

El estudio histológico de las placentas mostró el primer día después de la inoculación cambios inflamatorios focales en la pared de algunos vasos miometriales. Las arterias y arteriolas del miometrio y de la decidua en la base de implantación de

la placenta mostraron proliferación de las células deciduales alrededor del endotelio y de la pared muscular. El examen cuidadoso del endotelio de arterias y arteriolas mostró el reemplazo de las células endoteliales por células de apariencia similar a las células trofoblásticas (Fig. 2 a 5). El segundo día post inoculación



Figs. 6-7 Segundo día post inoculación. Cambios inflamatorios en vasos de la implantación placentaria que muestran abundantes células deciduales perivasculares. Hematoxilina - eosina X 100 (Reducción tipográfica - 1/3).

las arterias y arteriolas miometriales y deciduales mostraron signos de inflamación más severa con edema de las células deciduales y del tejido conectivo perivascular, infiltración con leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. La coloración de reticulina mostró como la malla reticular alrededor de cada célula comenzaba a fragmentarse. Las vellosidades coriales estaban edematosas y algunas arteriolas en la placa coriónica mostraron evidencias de necrosis fibrinoide (Figs. 6, 7). El tercer y cuarto día post inoculación las alteraciones vasculares eran más severas con necrosis fibrinoide de la pared vascular de infarto y hemorragias en la placenta, los cuales eran paralelos al grado de vasculitis en la decidua y el miometrio.

Inmunohistoquímica: El examen del material procesado con inmunoperoxidasa contra antígenos de EEV, mostró precipitados pardos que marcaban la positividad de la reacción desde el primer y segundo día post inoculación en las células deciduales perivasculares y en las células trofoblásticas que reemplazan el endotelio vascular (Figs. 8, 9, 10); algunas células fusiformes endometriales en la vecindad de los vasos sanguíneos también mostraron positividad para antígenos de EEV (Figs. 11 y 12). Estos cambios se hicieron más evidentes en las muestras del tercer y cuarto día post inoculación y fueron siempre negativos en las placentas de las ratas no inoculadas y en las placentas e las ratas inoculadas procesadas sin

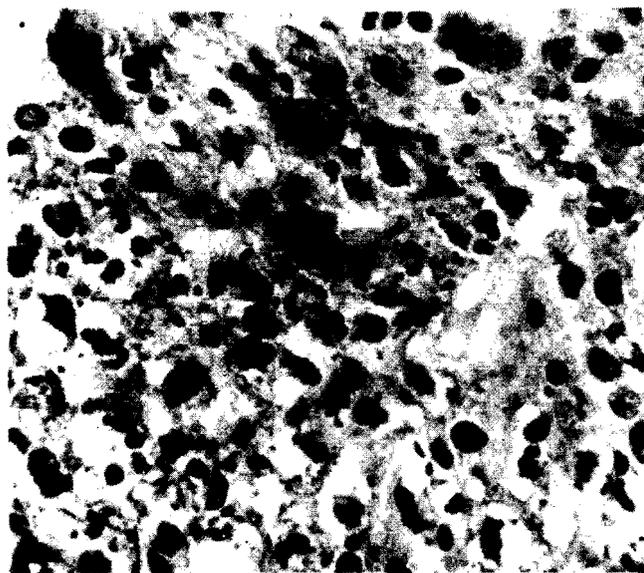


Fig. 8. Pared vascular con alteraciones inflamatorias que muestran positividad para peroxidasa - DAB en varias células deciduales. Anticuerpo contra EEV en conejo X 200.

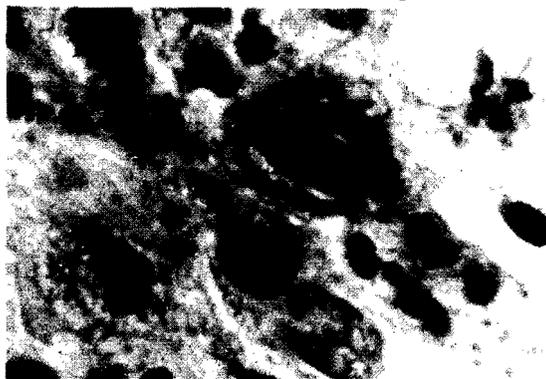


Fig. 9. Positividad para la peroxidasa - anti EEV en células deciduales de la pared vascular. X 400

adición del anticuerpo primario contra EEV. Los cambios necrotizantes en los fetos impidieron evaluar con precisión la positividad de la reacción inmunohistoquímica en ellos.

DISCUSION

Estudios virológicos realizados previamente en nuestro laboratorio han demostrado que el virus de la EEV se replica activamente en la placenta de las ratas entre el segundo y el cuarto día después de la inoculación intraperitoneal (13). La

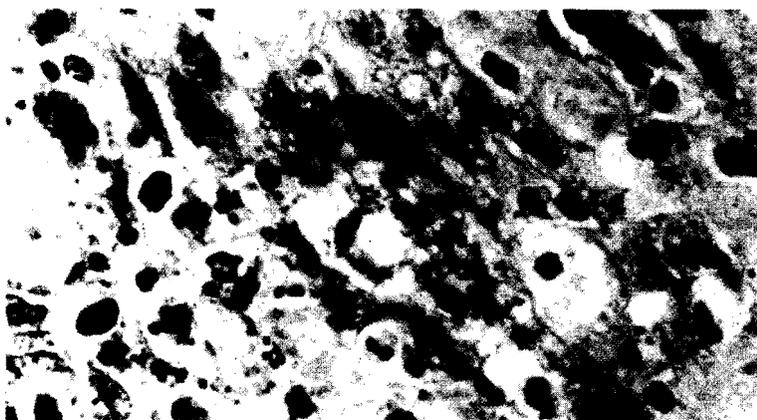
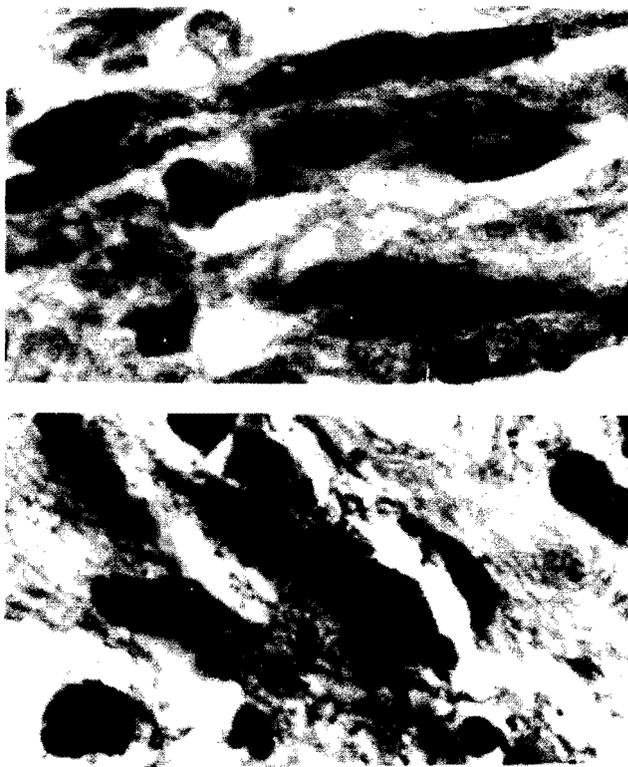


Fig. 10. Inflamación de la pared vascular y depósitos de peroxidasa anti EEV en células deciduales y miometriales.



Figs. 11-12. Mayor aumento de las células miometriales con depósitos de PAP - DAB anti EEV dos días después de la inoculación.
X 400

demostración inmunohistoquímica de la presencia de antígenos virales en las células deciduales perivasculares y en el trofoblasto de la rata, descritas en este trabajo desde el segundo día después de la inoculación ya habían sido señaladas por nosotros como otra evidencia de la replicación placentaria del virus de la EEV (12, 13).

En general se ha señalado que en las infecciones virales el estudio anatomopatológico de la placenta aporta muy poca información sobre la etiopatogenia de las mismas, a diferencia de las lesiones evidentes que caracterizan a las infecciones bacterianas (7) o micóticas (6). A pesar de estas afirmaciones, las alteraciones vasculares de la placenta humana en la infección con el virus de la rubéola (8, 15, 17, 22) y las descritas experimentalmente en ratas inoculadas con el virus de la EEV (12, 13), son muy evidentes y han sido destacadas como el mecanismo principal implicado en la patogenia de las lesiones fetales.

En el presente estudio demostramos cambios inflamatorios en el endotelio de los vasos útero-placentarios detectados durante la etapa inicial de la infección. Las lesiones necrotizantes de la placenta y el daño fetal correspondiente van a ser consecuencia de las alteraciones vasculares iniciales por lo que pensamos que la causa primaria de estas lesiones debe estudiarse examinando la vulnerabilidad endotelial de los vasos placentarios. Brosens (3) y recientemente de Wolf (4) han examinado el endotelio de los vasos

placentarios en humanos al final del embarazo y han descrito células trofoblásticas tapizando las paredes de las arteriolas espirales (3, 4).

Estas células trofoblásticas invasoras van a jugar un papel de células endoteliales y crecen hacia la región útero placentaria tapizando focalmente la pared de los vasos; este cambio fisiológico ha sido también examinado con la ayuda del microscopio electrónico en la placenta humana normal y se ha propuesto que las células trofoblásticas endotelizadas secretan holocrinamente un material fibrinoide que infiltra la pared vascular (23), y que ellas son capaces de elaborar una substancia con un efecto similar a la prostaciclina que intervendría en la prevención de los fenómenos trombóticos (16). Ya previamente habíamos señalado que la vulnerabilidad selectiva de los vasos placentarios podría estar relacionada con la presencia de células sincitiotrofoblásticas invasoras (12), de modo similar a la explicación que se le dió al daño focal endotelial inducido por la hipoxia crónica en la placenta de acures (5). Todos estos estudios nos llevan a considerar el fenómeno fisiológico del crecimiento endotelial del trofoblasto no veloso, como el factor fundamental implicado en la vulnerabilidad de los vasos útero-placentarios en nuestro modelo experimental con el virus de la EEV.

Posiblemente este mecanismo también esté relacionado con las lesiones vasculares de la placenta humana durante la infección con el virus de la rubéola. Esta hipótesis

está apoyada por hechos ya señalados en los resultados, como son la presencia de estas células tapizando los vasos, los cambios inflamatorios descritos, así como la positividad inmunohistoquímica para antígenos del virus de la EEV en las etapas iniciales de la infección placentaria.

Las alteraciones fetales descritas previamente en las ratas inoculadas con el virus de la EEV (12, 13) fueron del tipo necrotizante y se relacionaron siempre con las lesiones vasculares placentarias. Toundry describió necrosis endotelial en fetos humanos de madres que habían sufrido rubéola durante el embarazo (22). También en niños con síndrome post rubéola congénita se han descrito signos de vasculitis y mineralización de los vasos cerebrales (9), así como proliferación fibromuscular en la íntima con reducción del calibre arterial (9). La patogenia de estas lesiones no ha podido ser explicada satisfactoriamente, proponiéndose la persistencia de los virus de la rubéola con depósito de mucopolisacáridos y proteínas en el endotelio de los vasos cerebrales (18). Sin embargo las alteraciones vasculares de la placenta con embolización de células endoteliales necróticas sigue siendo considerada como la causa fundamental de las alteraciones congénitas inducidas por el virus de la rubéola en los humanos (1, 8, 15, 17, 22).

No dudamos en afirmar que es muy notoria la similitud entre la patogenia de las lesiones placentarias y consecuentemente el daño fetal en la infección intrauterina con

el virus de la EEV; esta comparación debe conducirnos a examinar más cuidadosamente todos los factores epidemiológicos, sociales, clínicos y patológicos involucrados en el problema de la encefalitis equina venezolana en nuestro medio. Posiblemente una investigación clínica y epidemiológica exhaustiva de nuestros habitantes en las áreas endémicas producirá resultados más valiosos que el estudio futuro sobre la ultraestructura o la inmunohistoquímica submicroscópica para detectar las partículas del virus de la EEV en las células invasoras del sincitiotrofoblasto.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ALFORD C.A., NEVA F.A., WELLER T.H.: Virologic and serologic studies of human products of conception after maternal rubeola. *New Engl J Med* 271:1275-1281, 1964.
- 2- ANDERSEN A.A., HANSON R.P.: Transplacental transmission of St. Louis encephalitis virus in mice. *Infect & Immun* 2:220-325, 1970.
- 3- BRONSENS I., ROBERTSON W.B., DIXON H.G.: The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol* 93:569-573, 1967.
- 4- DE WOLF F., DE WOLF-PEETERS C., BRONSEN I., ROBERTSON W.B.: The human placental bed. Electron Microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *Am J Obst & Gyn* 137:58-70, 1980.
- 5- DELAQUERRIERRE-RICHARSON L., VALDIVIA E.: Effect of simulated

- high altitude on pregnancy, Arch Path 84: 405-417, 1967.
- 6- DEL PRADO W.J., BAIRD P.J., RUSSELL P.: Placental Candidiasis of three cases with a review of the literature. Pathology 14:191-195, 1982.
 - 7- DRISCOLL S.G., GRAIG J.M.: Fetal and maternal status as reflected in the placenta. En: Genital and mammary pathology decennial 1965-75. pp 179-200. S C Sommers Edit. Appleton Cent Crofts. New York, 1975.
 - 8- DRISCOLL S.G. : Histopathology of gestational rubella. Amer J Dis Child 118: 49-53, 1969.
 - 9- ESTERLY J.E., OPENHEIMER E.H.: Intrauterine rubella infection In: Perspectives in pediatric pathology. pp 313-338. H.S. Rosenberg, R.P. Boland, Edit. 1973.
 - 10- GARCIA-TAMAYO J., ESPARZA J.: Importancia de la respuesta celular en el fenómeno encefalítico inducido por el virus de la encefalitis equina venezolana. Patologia 16:215-231, 1978.
 - 11- GARCIA-TAMAYO J, CARREÑO G., ESPARZA J.: Central Nervous system alterations as sequellae of Venezuelan equine encephalitis virus infection in the rat. J Pathol 128:87-91, 1979.
 - 12- GARCIA-TAMAYO J.: Encefalitis equina venezolana experimental, estudio histológico, histoquímico y ultraestructural. Invest Clin 21(4):277-371, 1980.
 - 13- GARCIA-TAMAYO J., ESPARZA J., MARTINEZ J.A.: Placental and fetal alterations due to Venezuelan equine encephalitis virus in rats. Infect & Immun 32:813-821, 1981.
 - 14- MELNICK J.L.: Taxonomía de los virus. Adel Microbiol Enf Infec 1: 177-224, 1982.
 - 15- MENSER M.A., REYE R.K.D.: The pathology of congenital rubella: A review written by request. Pathology 6:53, 1969.
 - 16- MYATT L., ELDER M.G.: Inhibition of platelet aggregation by a placental substance with prostacyclin like activity. Nature 268:159-167, 1977.
 - 17- ORNOY A., SEGAL S., NISHMI J., SIMCHA A., POLISHUK W.Z.: Fetal and placental pathology in gestational rubella. Am J Obst Gyn 116:949-956, 1973.
 - 18- RORKE L.B., SPIRO A.J.: Cerebral lesions in congenital rubella syndrome. J Pediat 70:243-255, 1967.
 - 19- SHINEFIELD H.R., TOWSEN T.E.: Transplacental transmission of western equine encephalomyelitis. J Pediatr 43:21-15, 1953.
 - 20- SINGER D.B., RUDOLPH A.J., ROSEMBERG H.S., RAWLS W.E., BONIUK M.: Pathology of the congenital rubella syndrome. J Pediat 71:665-671 1967.
 - 21- SPERTZEL R.O., CARBBS C.L., VAUGAN R.E.: Transplacental transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in mice. Infect & Immun 6:339-343, 1972.
 - 22- TOUNDRY G., SMITH O.N.: Fetal Rubella Pathology. J Pediat 68:867-872, 1966.
 - 23- WIGGER A.J.: Villous fibrinoid of the placental. The result of endocrine secretion of the cytotrophoblast. Am J Path 86:82, 1977.