

Alteraciones ocasionadas por el virus de la rubéola en embriones de conejas infectadas durante el embarazo

T. RODRÍGUEZ, E. DOVALE, S. BARCELONA Y A. AGUILERA

Dptos. de Biología Celular y Virología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 15 de diciembre de 1977

Recibido: 27 de junio de 1978

ABSTRACT. Cytotoxic effects on embryos from rabbits infected by rubella virus during pregnancy. Several studies upon the teratogenic effects produced by rubella virus have been performed. In these, multiple histologic, clinic, and immunologic alterations have been reported in embryos and newborn children with Rubella Syndrome. However, in the E. M. fields not much work has been done, with regards to the mechanisms involved in those malformations. Our work has as its object the study of ultrastructure of some affected organs. Thymuses, livers and spleens from embryos and newborn rabbits whose mothers were infected with rubella virus during 7th day of pregnancy, were studied by E. M. We have found a breakdown of cortex thymus cells, as well as mature, virus-like particles in 21 day old embryos. Thus, there is a possibility that rubella virus acts directly diminishing the number of cells by breaking them down in this model.

RESUMEN. Los efectos teratogénicos del virus de la rubéola han dado lugar a diversos estudios, reportándose múltiples alteraciones histológicas, clínicas e inmunológicas en embriones y niños nacidos con el síndrome rubeólico. Sin embargo, en el campo de la microscopía electrónica existen pocos trabajos reportados que puedan esclarecer los mecanismos que llevan a tales malformaciones. Nuestro trabajo tiene como objetivo estudiar la ultraestructura de algunos órganos afectados. Los timos, hígado y bazos de embriones y gazapos cuyas madres se inocularon con el virus de la rubéola al 7mo. día de embarazo, fueron estudiados al microscopio electrónico encontrándose destrucción de las células de la corteza del timo, así como estructuras semejantes a partículas maduras del virus en los embriones de 21 días lo que nos hace pensar en la posibilidad de que el virus actúe directamente disminuyendo el número de células por destrucción de las mismas en el caso del timo.

INTRODUCCION

La rubéola constituye una de las infecciones virales que mayores alteraciones causa a fetos de madres que contrajeron la enfermedad en el primer trimestre del embarazo.

Diversos estudios clínicos, histológicos e inmunológicos, se han realizado para determinar el mecanismo o los mecanismos por los cuales el virus puede causar dichas alteraciones. Se ha comprobado la persistencia de altos títulos del virus, así como aislado el mismo en faringe y orina de niños recién nacidos con el síndrome rubeólico (*Alford y cols., 1964; Menser y cols., 1967; Plotkin y cols., 1963; Weller y cols., 1964*). Todo esto, unido a las evidencias histológicas de alteraciones del tejido linfoide, incluyendo el timo (*Singer y cols., 1969*) y la incapacidad de respuesta de los linfocitos de niños con el síndrome rubeólico frente a la fitohemaglutinina (*Montgomery y cols., 1967; Olson y cols., 1967; Olson y cols., 1968*) han hecho pensar que existe una deficiencia en la respuesta inmunológica en estos casos. En estudios histológicos realizados en la rubéola y en otras enfermedades virales, se ha podido comprobar que las mayores alteraciones se producen en el endotelio capilar (*Köder, 1968; Menser y Reye, 1974; Töndury, 1962; Töndury, 1970*). Basándose en estos hechos y por la carencia de datos ultraestructurales, Kistler (1975), realizó un estudio al microscopio electrónico de las células endoteliales. A pesar de encontrar daños celulares y de aislar el virus de los tejidos estudiados no logró visualizar partículas virales maduras en los mismos.

En el presente trabajo se realiza un estudio ultraestructural y virológico de algunos órganos afectados en el síndrome rubeólico con el objetivo de profundizar en los mecanismos de dichas alteraciones.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 10 conejas de Nueva Zelandia, 5 de las cuales fueron inoculadas con la cepa salvaje M-23 del virus de la rubéola (10 ml por vía endovenosa con un título de $10^{5.6}$ TCID 50/ml. La inoculación se efectuó al 7mo. día de apareadas las conejas. Los fetos (4 para cada edad)

fueron obtenidos por histerectomía total a los 15, 21 y 29 días de embarazo. A dos de las conejas se les dejaron finalizar el embarazo para tomar gazapos de 5 y 30 días de nacidos (2 por cada edad). Se siguió igual procedimiento con las restantes conejas, exceptuando la inoculación del virus tomándose sus fetos y gazapos como controles.

De los fetos y gazapos así obtenidos se extrajeron hígado, bazo y timo (de acuerdo al desarrollo embrionario).

Para la microscopia de luz los fragmentos fueron fijados en Bouin, incluidos en parafina, cortados y teñidos con hematoxilina y eosina.

Microscopia electrónica.

Pequeños fragmentos de los órganos fueron prefijados en glutaraldehido al 3.2% en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2 y postfijado en OsO₄ al 2%. Se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, incluyéndose en Epón. Los bloques se cortaron en el ultramicrótomo Ultrotome III de la LKB. Se contrastaron las rejillas en acetato de uranilo y citrato de plomo, para observarse en los microscopios electrónicos HS-7 de la Hitachi y BS-500 de la Tesla.

Aislamiento viral.

En los embriones de 15 días fue posible individualizar los órganos por su pequeño tamaño y por ese motivo se hizo un macerado del embrión completo. En los fetos de 21 y 29 días y los gazapos fue factible individualizar los órganos procediéndose al aislamiento viral de hígado, timo y bazo.

Los macerados fueron inoculados en la línea celular de riñón de conejo (RK-13). Después de tres pases a las muestras que presentaron efectos citopatogénicos se les realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Inmunofluorescencia indirecta.

Cubreobjetos con células inoculadas con las muestras se fijaron con acetona a 20°C durante 20'; luego se les agregó suero hiperinmune hu-

mano en una dilución de 1:4 dejándose 45' a 37°C, se lavaron posteriormente tres veces con PBS para agregarles al suero Anti IgG humana conjugado con isoftiocinato de fluoresceína, dejándose a 37°C durante otros 45'. Por último fueron lavados tres veces (15' cada vez) y puestos en un portaobjeto con glicerina tamponada como montante. Se observaron en el fotomicroscopio Karl Zeiss.

RESULTADOS

En los embriones de 15 y 19 días los estudios histológicos, ultraestructurales y virológicos fueron negativos.

En el grupo de 21 días fue donde se encontraron mayor número de alteraciones.

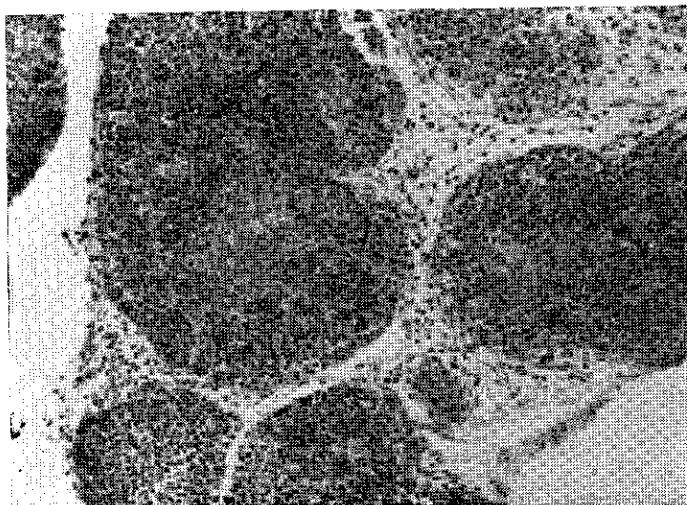


Fig. 1. Vista panorámica del Timo de embrión de 21 días, infectado con el virus de la rubéola. 77 x.

Al microscopio de luz se encontró en los timos de los 4 embriones una disminución de las células que constituyen la corteza del órgano (timo-

citos) predominando las células claras de la médula; (Fig. 1) este hallazgo fue evidente en todos los embriones estudiados, pero más marcado en 2 de ellos, en los cuales el virus fue aislado directamente del timo; además de esta alteración se observó un aumento del tejido fibrótico de los tabiques, así como en un caso una ligera hemorragia subcapsular. El estudio ultraestructural corroboró los datos anteriores al encontrarse una marcada destrucción de los timocitos (Fig. 2), manifestadas por ensanchamiento del espacio perinuclear, degeneración de las mitocondrias y borramiento de las estructuras normales de la célula, también se observó evaginaciones del citoplasma que contenían un material homogéneo en su interior (Zeiosis, Fig. 3). Partículas redondeadas de 70 a 90 nm de diámetro las cuales contenían en su interior un núcleo denso de 30-45 nm, estaban presentes en los timocitos dañados (Fig. 4). Hay que señalar que se encontraron partículas con iguales características pero de mayor tamaño, las que alcanzaron hasta 125 nm de diámetro. Otras partículas electrón densas y cercanas al núcleo fueron también observadas; su diámetro varió entre 45 y 60 nm.

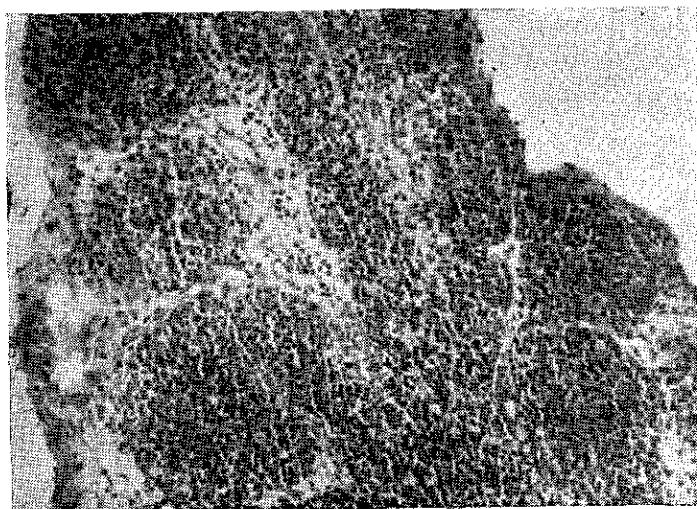


Fig. 2. Vista panorámica de un corte de Timo de embrión de 21 días control. 77 x.

Los estudios realizados en hígado no ofrecieron datos a la microscopía de luz con excepción del número de megacariocitos que era mayor en los inoculados que en los controles (Fig. 5).

Sin embargo, la ultraestructura de algunas células retículo endoteliales estaba alterada mostrando en su citoplasma diversos cuerpos con figura de mielina, una formación túbulo reticular similar a los planteados por Kistler en 1975 (Fig. 6). Partículas cercanas al núcleo semejantes a las del timo fueron observadas (Fig. 7).

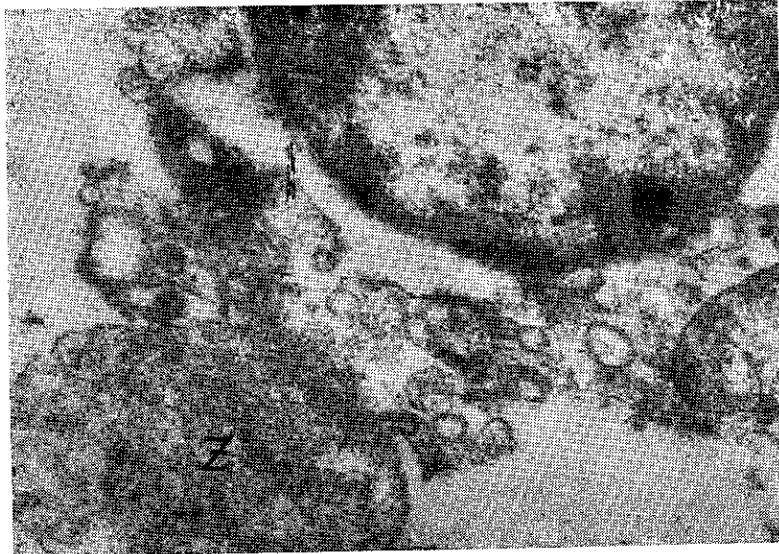


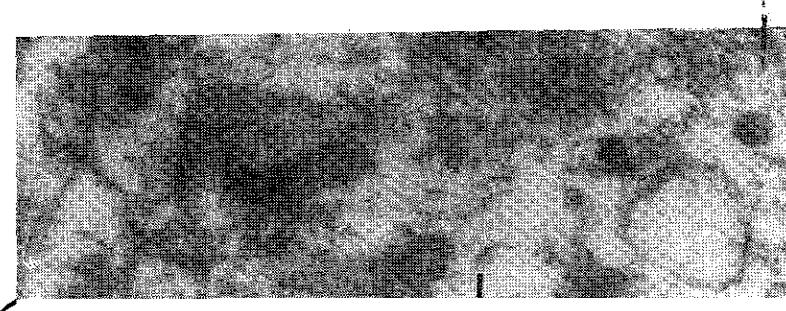
Fig. 3. Microfotografía electrónica de un Timocito que presenta degeneración así como evaginaciones citoplasmáticas, Zeiosis (Z) 18,741 x.

Los megacariocitos del hígado presentaban proyecciones citoplasmáticas semejantes a las encontradas en los timocitos sin evidenciar signos de destrucción ni degeneración en los mismos (Fig. 8). Debe señalarse que de los órganos de estos embriones fue posible aislar el virus siendo positivo el estudio de inmunofluorescencia realizado.

Aunque en los gazapos de 5 y 30 días de nacidos se aisló el virus no se encontraron alteraciones en los órganos de dichos animales, conservando éstos su arquitectura normal.

DISCUSION

Las alteraciones encontradas en timo nos hablan de una disminución del desarrollo normal del órgano (hipoplasia) encontrada también por otros autores en niños recién nacidos con rubéola congénita (*García y cols., 1974; Singer y cols., 1969*). Esta hipoplasia puede ser debida a la acción directa del virus sobre los timocitos llevándolo a la destrucción pues además de haberse aislado el virus del tejido, la presencia de partículas redondeadas de 70-90 nm de diámetro, con un núcleo denso de 30-45 nm nos hace pensar que estemos ante formas maduras del virus pues son similares a las descritas por Holmes y Warbusten (1967), para el virus de la rubéola.



Tenemos que señalar que el tamaño de dichas partículas sobrepasó el límite encontrado por otros autores (*Best y cols., 1967; Holmes y cols., 1969*) que es de 60 nm, sin embargo, hay que aclarar que los estudios para determinar la estructura del virus se han efectuado en células de cultivos, los cuales han sufrido varios pases, esto parece estabilizar la morfología del virus, pues en trabajos donde se han efectuado pocos pases se observa un alto pleomorfismo y partículas hasta de 100 nm (*Kistler, 1975*). Nuestro trabajo se realizó "in vivo" donde aún no han sido descritas estas partículas maduras, creemos que esta variación en las dimensiones se deban al medio en que se encuentra el virus en el organismo.

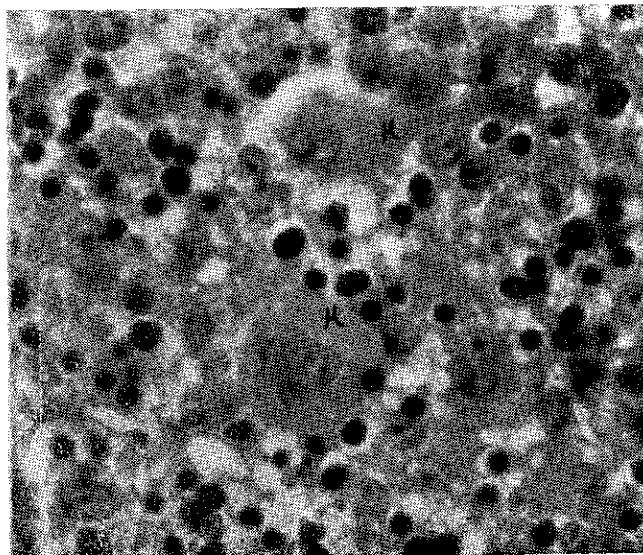


Fig. 5. Microfotografía óptica de hígado en embrión de 21 días infestado donde se observan 2 megacariocitos de apariencia normal (M) 610 x.

El número elevado de magacariocitos en los hígados en los embriones infectados corroboró los hallazgos de Machado y cols., (1975) y Zinkham y cols., (1967), aunque sólo encontramos en la ultraestructura las evaginaciones del citoplasma (Zeiosis). Estos resultados sugieren que las células pudieran dañarse con la acción del virus y de este modo inter-

fiera en los mecanismos de la coagulación dando lugar a la púrpura trombocitopénica descrita por Barmalvala y cols., (1965) y Cooper y cols., (1965), en la rubéola congénita.

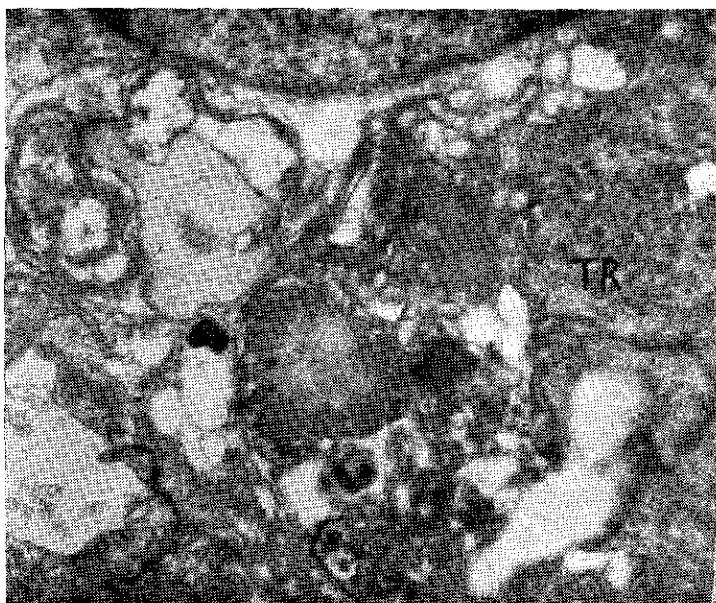


Fig. 6. Célula Reticuloendotelial de hígado de embrión de 21 días en la que se observan diversos cuerpos de mielina así como un complejo tubuloreticular (TR) 6,161 x.

De los daños encontrados en el hígado, podemos decir que se asemejan a los descritos por Kistler (1975), por lo cual no podemos negar que una de las alteraciones que ocasiona el virus a los embriones es el daño de las células retículo endoteliales y que también éste pueda ser uno de los mecanismos por lo cual el virus cause los efectos teratogénicos en los embriones de 21 días que han padecido la enfermedad.

Con respecto al tipo de partículas encontradas cerca del núcleo (tanto en hígado como en timo) nos llamó la atención el hecho de haberse observado con anterioridad en trabajos realizados por nuestro grupo en macrófagos peritoneales (Dovale y cols., 1977).

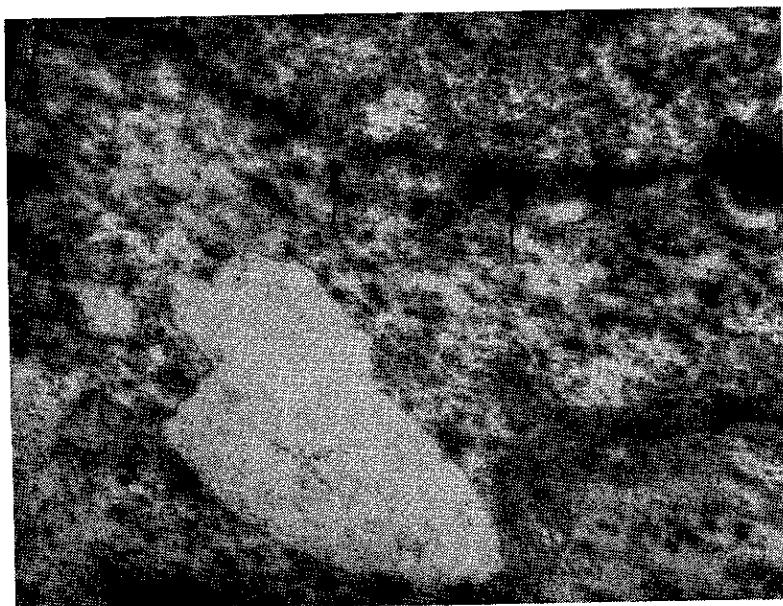


Fig. 7. Partículas densas cercanas al núcleo se observan en hepatocitos de embriones de 21 días infectado con el virus. 18,485 x.

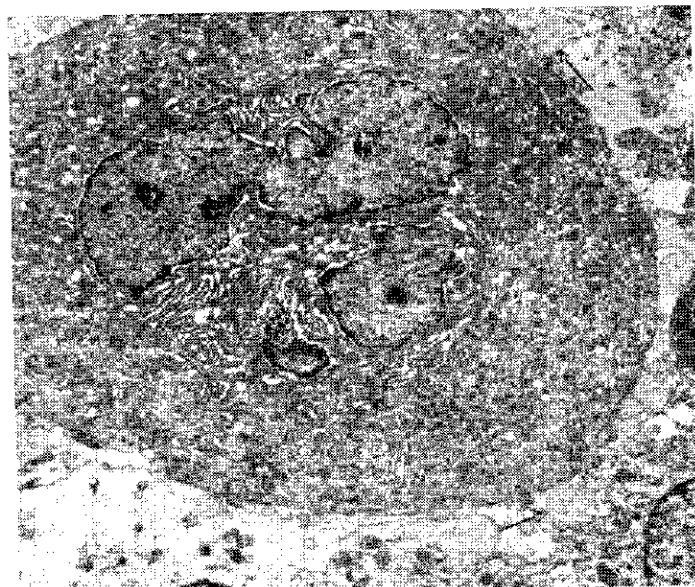


Fig. 8. Microfotografía electrónica de Megacariocito en un corte de hígado donde se observan evaginaciones citoplasmáticas, Zeiosis (↗) 1,078 x.

Estas partículas pudieran ser de origen viral o incluso formas inmaduras del virus, por lo que son necesarios emprender otros estudios que esclarezcan el origen y significado de las mismas.

REFERENCIAS

- ALFORD JR. C. A., NOVA F. AND WELLER T. H. Virologie and serologic studies on human products of conception after maternal rubella. *N. Engl. J. Med.* 271, 1275, 1964.
- BARMALVALA J. E., NORMAN D. M., PAYNE M. C. AND CHIEK L. Rubella syndrome and thrombocytopenic purpura in new born infants. *New England J. Med.* 173, 474, 1965.
- BEST J., BANATVALA J., ALMEIDA J. AND WATERSON A. P. Morphological characteristics of rubella virus. *Lancet II*, 237, 1967.
- COOPER L. J., GREEN R. H., KRUGMAN S., GILES J. P. AND MIRECK G. Neonatal thrombocytopenic purpura and other manifestations of rubella contracted in utero. *Amer. J. Dis. Child.* 110, 416, 1965.
- DOVALE E., RODRÍGUEZ T., BARCELONA G. Y AGUILERA A. Acción del virus de la rubéola sobre los macrófagos peritoneales de rata. Estudio ultraestructural. Libro de Resúmenes del VI Seminario Científico del CENIC. Habana, Dic. 1977.
- GARCÍA A. G., OLINFO F. AND FORTES T. G. Thymic hypoplasia due to congenital rubella. *Arch. Dis. Child.* 49, 181, 1974.
- HOLMES I. H. AND WARBURTON M. F. Is rubella an arborvirus? *Lancet, II*, 1967.
- HOLMES H. I., WARK C. M. AND WARBURTON F. M. Is rubella and arborvirus II Ultrastructural Morphology and Development. *Virology* 37, 15, 1969.
- KISTLER G. S. Cytoplasmic tubuloreticular Complexes and Nuclear Bodies in cells of rubella-infected human embryos and fetuses. *Beitr. Path. Bd.* 155, 101, 1975.
- KÖDER K. A. Bioteln in der Frühschwaugerschaft. Mi knosko pische Befende au hergen und den herzuahen groben bei 90 Keimlingen. *Arch. Julius Kldus-Stiftung.* 43/44, 3-55 1968/1969.
- MACHADO R., CUTIÉ E. Y DOVALE E. Incremento significativo de los Megacariocitos circulantes en embriones de conejas infectadas por el virus de la rubéola. *Revista Cubana de Ginecología y Obstetricia* (en publicación).
- MENSER M. A., HARLEY J. D., HERZBERG R. AND DORMAN O. C. Persistence of virus in lens for three years after prenatal rubella. *Lancet*, 2, 387, 1967.

- MENSER M. A. AND REYE R. D. The pathology of congenital rubella a review written by request. *Pathology*, 6/3 215, 1974.
- MONTGOMERY S. R., SOUTH M. A., RAWLS W. E., MELNIEK J. L., OLSON G. B., DENT P. B. AND GOOD R. A. Viral inhibition of Lymphocyte response to phytohemagglutinin. *Science*, 157, 1068, 1967.
- OLSON G. B., SOUTH M. A. AND GOOD R. A. Phytohemagglutinin unresponsiveness of lymphocytes from babies with congenital rubella. *Nature (London)*, 214, 695, 1967.
- OLSON G. B., DENT P. B., RAWLS W. E., SOUTII M. A., MONTGOMERY J. R., MELNIEK J. L. AND GOOD R. A. Abnormalities of in vitro lymphocyte responses during rubella virus infections. *J. Exp. Med.*, 128, 47, 1968.
- PLOTKIN S. A., NUDGEON J. A. AND RAMSAY A. M. Laboratory studies on rubella and the rubella syndrome. *Brit. Med. J.* 2, 1296, 1963.
- SINGER D. B., SOUTH M. A., MONTGOMERY J. R. AND RAWLS W. E. Congenital rubella syndrome lymphoid tissue and immunologic status. *Amer. J. Dis. Child.*, 118, 54, 1969.
- TÖNDURY G. Embryopathie. Über die Wirkungswire von viren auf den meuschlichen Keimling. Springer, Berlin, 1962.
- TÖNDURY T. A. Über BlutgefäBschädigungen im Rahmen einer Verusembryopathie. Diss Univ. Zürich, 1970.
- WELLER T. K., ALFORD JR. C. A. AND NEVA F. A. Retrospective diagnosis by serologic means of congenitally acquired rubella infections. *N. Engl. J. Med.*, 270, 1073, 1964.
- ZINKHAM W. H., MEDEARIS UN JR. AND OCBORU J. C. Blood and bone marrow finding in congenital rubella. *J. Peatr.*, 71, 512, 1967.