

## Estudio cito e histopatológico cervicovaginal en ratón infectado experimentalmente por virus herpes genital

Por los Dres.:

ISRAEL BORRAJ ERO,\* ERNESTO BRAVO,\*\*  
VILMA COLLAZO\*\*\*

Borrajero, I. et al. *Estudio cito e histopatológico cervicovaginal en ratón infectado experimentalmente por virus herpes genital*. Rev Cub Med 14: 2, 1975.

Se presentan los resultados cito e histopatológicos referentes a la infección experimental producida en el tracto cervicovaginal de ratones, los que presentan similitud con los observados en humanos. La partícula viral pudo comprobarse también por técnica virológica, así como por microscopía electrónica. Se ratifica la utilidad del ratón para estos estudios, lo que permitirá emprender futuras indagaciones sobre latencia, recidiva y probable actividad cancerígena del virus herpes genital.

El virus herpes simple despierta todavía cierto interés, ya sea por el amplio espectro de las patologías que origina, como por su latencia y recidiva, problemas no resueltos aún.

No produce enfermedades graves, a no ser los casos de queratoconjuntivitis herpética y herpes neonatales.

Por ello sorprendió que, en 1968, un grupo de profesionales encabezados por el Dr. *Andrés Nahmías*, e integrado por ginecólogos, virólogos y patólogos haya lanzado la sospecha que el virus herpes simple, tipo genital, muchas veces hallado en el esmegma del hombre, podría causarle a la mujer, carcinoma del útero.<sup>1</sup>

Desde entonces y alentados por serias evidencias de oncogenicidad encontradas

en otros virus del grupo herpes, en particular con el linfoma de Burkitt, aumentaron ostensiblemente los trabajos científicos sobre el herpes genital como probable virus oncogénico.

Haciendo una apretada síntesis de los mismos: hay datos seroepidemiológicos demostrativos de que un alto porcentaje de pacientes afectadas de carcinoma del cuello del útero, poseen anticuerpos contra el virus y de alto título neutralizante.<sup>2</sup>

Además, el seguimiento durante seis años de mujeres afectadas de infección herpética genital activa, detectadas por la prueba citológica de rutina, mostró que un 23,7% de ellas desencadenaron al cabo de ese tiempo procesos malignos, contra 1,6% de signos premalignos de los controles.<sup>3</sup> En el terreno experimental se obtuvieron tumores en hámster por medio de la inoculación del virus herpes genital.<sup>4</sup> También se ha logrado transformación celular en células de hámster mantenidas en cultivos de tejidos.<sup>5</sup> Por otra

\* Profesor de anatomía patológica, Universidad de La Habana. Hospital "Calixto García".

\*\* Profesor de bioquímica. Facultad de Ciencias Médicas y virólogo del CNIC.

\*\*\* Instructora de anatomía patológica. Escuela de estomatología. Universidad de La Habana.

parte, pudo observarse la presencia de partículas virales en células de líneas originadas de un fragmento de carcinoma de útero, que fueron mantenidas en cultivo durante tres semanas.® En fecha reciente se ha podido detectar en tejido humano de cáncer cervical, ácido desoxirribonucleico (ADN) perteneciente al genome viral, sin hallarse ni el virus ni su antígeno viral; para lograrlo se ha empleado la técnica de "hibridización molecular".<sup>7</sup>

Muchos datos útiles han sido obtenidos por medio de animales de experimentación. Por ejemplo, mediante el empleo de ratones hembras (que poseen una citología exfoliativa y composición tisular cervicovaginal, bastante similar a la humana) se consiguió producir carcinoma de útero por inoculación del virus.<sup>8</sup>

Dimana de la relación anterior una impresionante acumulación de datos en solo pocos años que, aunque alentadores, dejan muchas interrogantes sin resolver.

En el presente trabajo se ha utilizado como animal experimental al ratón, infectándosele el tracto cervicovaginal con el virus herpes genital. Fueron realizados estudios citológicos y virológicos, así como al microscopio electrónico.

#### MATERIAL Y METODO

Se utilizaron ratones hembras suizas blancas de unos cuarenta a cincuenta días de nacidas. Veinte de ellas fueron inoculadas con la cepa prototipo de virus herpes genital MS<sup>9</sup> de título 10<sup>8</sup> UFP/0,1 mi y ocho reservadas como controles. Para la infección se introdujo por el tracto genital un hisopo de algodón estéril previamente humedecido en solución salina PBS, mojada en la suspensión viral y dejada hasta el otro día. Al quinto o sexto día después de la inoculación, se hicieron los frotis luego de introducir en el tracto genital

un hisopo de algodón previamente mojado en PBS. Cada muestra así obtenida fue sometida al proceso de fijación de rutina, haciéndose coloraciones de H-E y de Papanicolaou. Los estudios histopatológicos fueron realizados con úteros obtenidos luego de la certeza citológica de la infección. Para microscopía electrónica fue utilizado el método usual de fijación e inclusión, empleándose el microscopio Hitachi HU- 11 A.

#### RESULTADOS

Como consta en el primer cuadro, casi el 100% de los frotis de los casos infectados, de los que pudieron obtener muestras suficientes, tenían alteraciones citopáticas y reacciones inflamatorias. Las alteraciones más sobresalientes fueron en este orden: hiperromatismo, halo perinuclear, cariólisis, anisonucleosis, pérdida de la afinidad tintoreal del núcleo, vacuolización, células multinucleadas formando sincitio (cuadro I, figuras 1 y 2), balonamiento y cuerpos de inclusión. Fue difícil obtener muestras citológicas abundantes y libres de artefactos. Las alteraciones señaladas pudieron observarse más claramente con H-E que con Papanicolaou. En uno de los controles se observaron algunas alteraciones celulares, aunque leves.

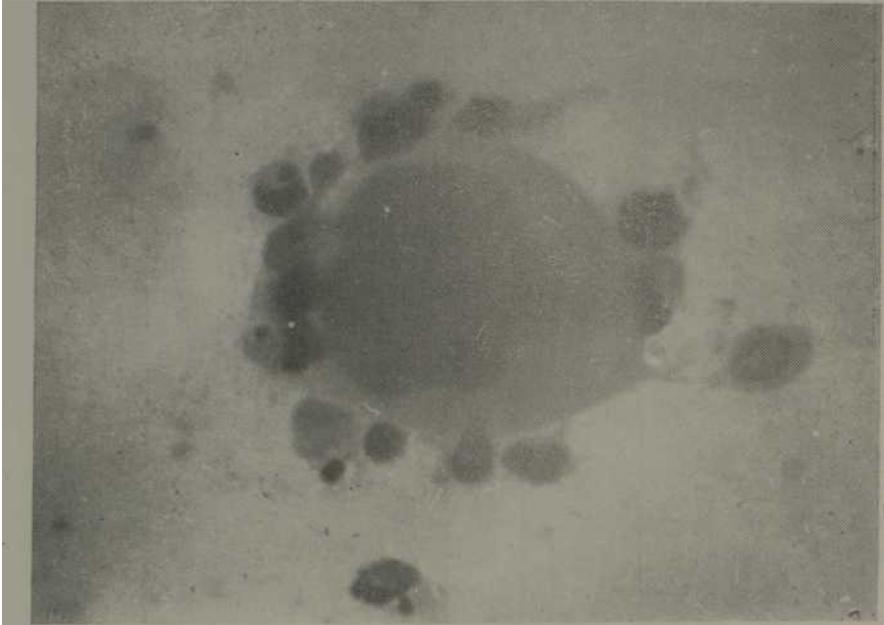
En los cortes histológicos los efectos de la infección fueron más evidentes (cuadro II), pudiéndose observar en el 90% de los casos, cuerpos de inclusión, balonamiento, células multinucleadas con formación de sincitio (figuras 3 a 7) en cuello y alteraciones similares en epitelio endometrial.

Uno de los ratones hembras desarrolló al décimo día de la inoculación, un proceso de parálisis de las extremidades posteriores, luego de un fuerte cuadro irritativo en la zona genital. Al realizársele,

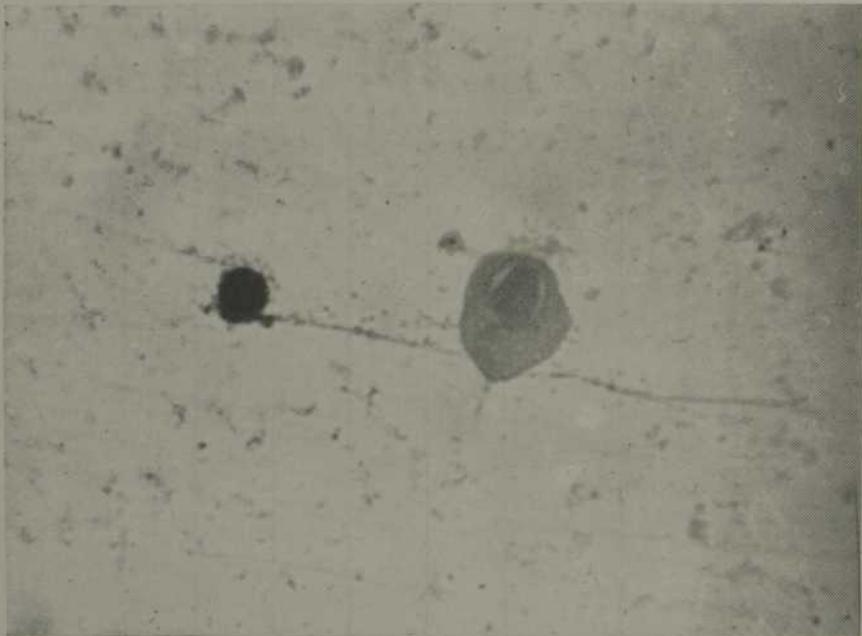
CUADRO I

ESTUDIO DE LA CITOLOGIA EXFOLIATIVA DEL TRACTO GENITAL EN RATONES  
HEMBRAS INFECTADAS CON VIRUS HERPES GENITAL

Cruces	RI	Arte- factos	Hipercro- matismo	Halo peri- nuclear	Cel. multi- nucleadas	Carióli- sis	Vacuoli- zación	Pérdida afinidad tintorial	Anisonu- cleosis	Cuerpos inclusión	Balona- miento
0	1	1	0	1	6	1	5	3	2	12	7
X	1	8	3	8	4	2	7	3	4	2	4
XX	8	5	11	5	3	9	2	8	8	0	3
XXX	3	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0
XXXX	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



*Fig. 1*



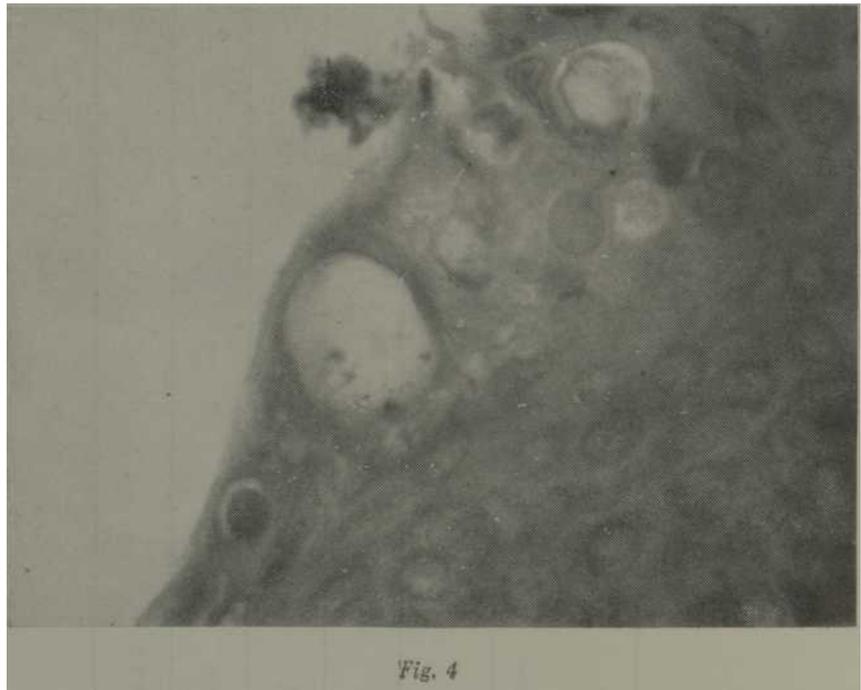
*Fig. 2*

CUADRO II  
HISTOPATOLOGIA DEL UTERO DE RATONES HEMBRAS INFECTADAS CON VIRUS  
HERPES GENITAL

RI	Arte- factos	Hipercro- matismo	Halo peri- nuclear	Cel. multi- nucleadas	Carióli- sis	Vacuoli- zación	Anisonu- cleosis	Cuerpos de inclusión	Balona- miento	Alteracio- n epitelio- endometrial
0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
0	1	0	2	2	2	1	4	2	5	2
5	2	8	7	2	6	8	5	6	2	6
0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	0
4	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0



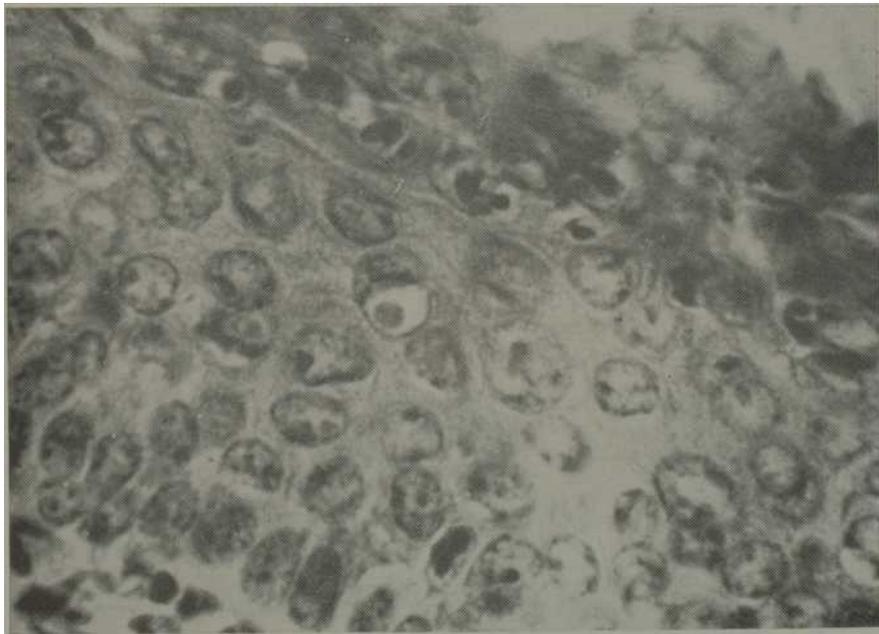
*Fig. 3*



*Fig. 4*



*Fig. 5*



*Fig. 6*

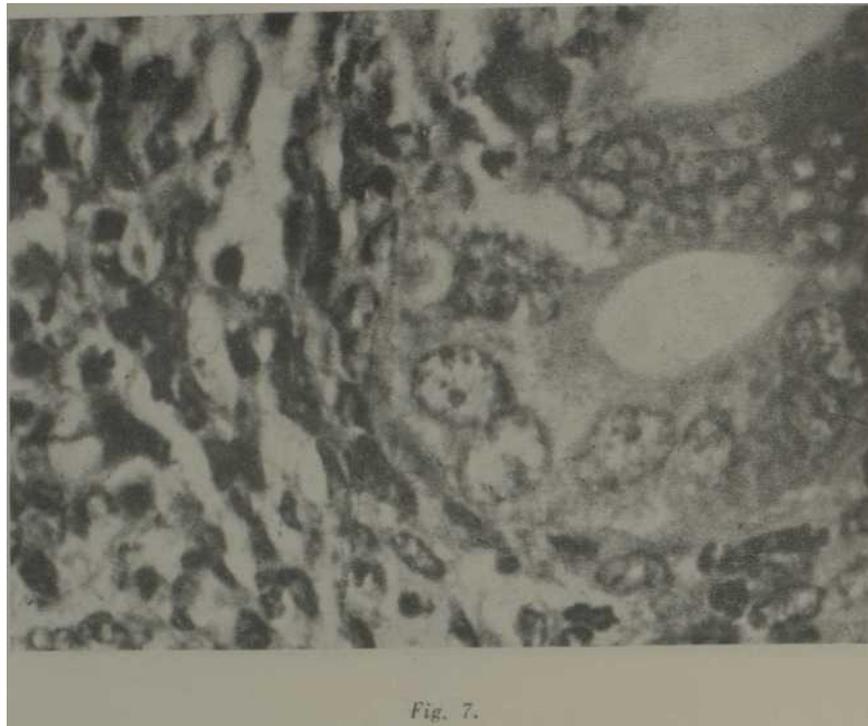


Fig. 7.

al sexto día de la infección una prueba virológica, pudo confirmarse la presencia de virus herpes (figuras 8 y 9).

Debe destacarse que hubo un 100% de correspondencia entre el proceso infectivo citológico y el observado luego por histopatología del útero.

Uno de los úteros obtenidos de un ratón hembra, luego de la detección de la infección viral por citología exfoliativa, fue destinada a microscopía electrónica, pudiéndose localizar la partícula viral en el útero, la que coincide en su morfología y dimensiones a la del virus herpes (figura 10).

La mayoría de los datos obtenidos concuerdan con los observados por otros autores, ya sea con ratones,<sup>10</sup> como la infección en humanos.<sup>11</sup>

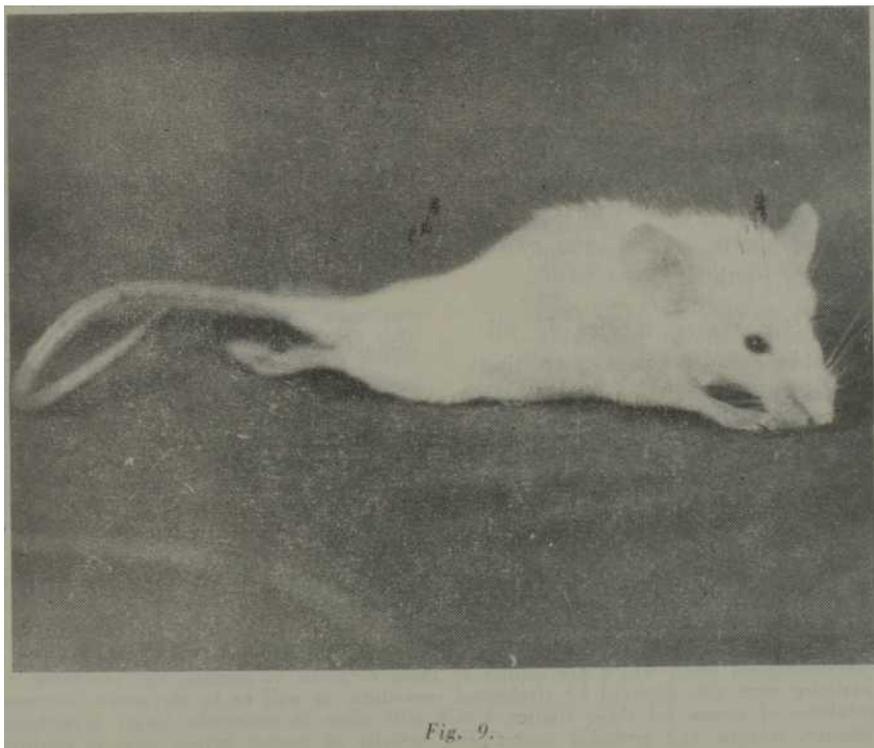
#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

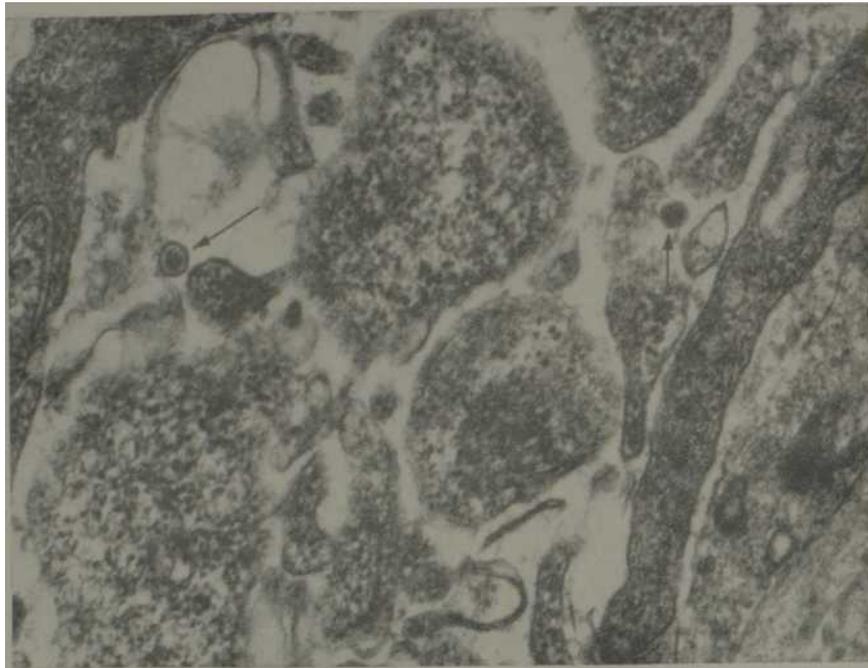
Los resultados histopatológicos son claros y terminantes en cuanto a la evidencia

de la infección viral; no lo son en la misma medida los obtenidos en la citología exfoliativa. Ha sido difícil obtener muestras abundantes y libres de artefactos, lo que pudiera explicar la dificultad en observar un mayor número de células con cuerpos de inclusión. El trabajo con ratones hembras es útil para estas investigaciones y debería mejorarse más aún la obtención de muestras para la citología exfoliativa. De todas maneras, estas dificultades no suelen presentarse en la obtención de muestras en humanos.

La aparición de un ratón hembra con parálisis de las extremidades posteriores, es un hecho ocurrido en algunas oportunidades en nuestros trabajos y es una consecuencia de la tendencia neurotrópica del virus herpes, particularmente de esta cepa.

Es igualmente de interés señalar las evidentes alteraciones del epitelio endometrial en un 90% de los úteros infectados.





*Fig. 10.*

Este dato contradice la existencia de una barrera contra el avance del virus, a partir del cuello del útero, sugerida por algunos autores.<sup>10</sup>

Resulta interesante la localización de partículas de virus herpes en el útero infectado, dato no reportado aún en la bibliografía, por cierto, escasa, que existe sobre este tema particular.<sup>12</sup>

En nuestro trabajo se ratifica la utilidad del ratón hembra para este tipo de investigaciones.

Los resultados obtenidos posibilitan abordar en el futuro el análisis de las pruebas citológicas de rutina en humanos, a fin de detectar la lesión herpética y decidir el seguimiento de esos casos. Igualmente constituye una base para estudiar la infección incluso reiterada del animal, tanto con el virus herpes activo, como inactivo por luz ultravioleta, que ha resultado oncogénico para células de cultivo; esto podría ayudar a desentrañar algunas interrogantes de la recidiva y de la probable relación que pudiera existir entre este virus y el carcinoma de cérvix.

#### SUMMARY

Borrajero, I. et al. *Cyto and histopathological cervicovaginal study in the mouse experimentally infected with genital herpes virus.* Rev Cub Med 14 : 2, 1975.

Cyto and histopathological results with respect to the experimental infection induced in the mouse cervicovaginal tract, which are similar to those obtained in humans, are presented. Virus particles were also detected by virological procedure, as well as by electronic microscopy. The usefulness of mouse for these studies, which will allow to undertake future investigations about latency, relapse, and probable cancerigenic activity of genital herpes virus is confirmed.

## RESUME

Borrajero, I. et al. *Etude cytopathologique et histopathologique injectée cervico-vaginal chez la souris expérimentalement par le virus herpes genital.* Rev Cub Med 14: 2, 1975.

On présente les résultats cytopathologiques et histopathologiques obtenus dans l'infection expérimentale produite dans le tractus cervico-vaginal des souris, lesquels sont similaires à ceux observés chez les humaines. La particule virale a pu se vérifier par la technique virologique. L'utilisation de la souris à ce propos nous permettra de développer des recherches sur latence, la récurrence et l'activité cancérogène probable du virus herpes genital.

## FE3KME

**EnnTMxeDO H. a OT. UepBHKOBArimajitHoe RUTO- H  
raeTonaTOflorireecaos HsyReHze<sup>o</sup>y wniefl, OHHTHO  
KH\$eKmrpoBaHHHi BHpycoM repnec remiTan.**

**Rev CuB Mea lh: 2, 1975.reraofi jieHTejiBHocTH BHpyca repnec  
remiTan.**

## BIBLIOGRAFIA

- *Josey, W. E. et al.* Genetical infection with type 2 herpes virus hominis: present knowledge and possible relation to cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 101: 718-729, 1968.
- *Rawls, W. E. et al.* An analysis of sero-epidemiological studies of herpes virus type 2 and carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 33: 1477-1482, 1973.
- *Naib, Z. M. et al.* Genital herpetic infection. Association with cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 23: 940, 1949.
- *Nahmias, J. A. et al.* Sarcoma after inoculation of newborn hamsters with herpes virus hominis type 2 strains. *Proc Soc Exp Biol Med* 134: 1065, 1970.
- *Rapp, F., R. G. Duff.* Oncogenic transformation of hamster cells by herpes virus type 2. *Proc. 2 nd. Int. Congr. Virology, Budapest, 1971*, pp. 74. S. Karger, Basel, 1972.
- *Aurelian, L. et al.* Herpes virus type 2, isolated from cervical tumor cells grown in tissue culture. *Science* 174: 704-707, 1971.
- *Roizman, tí., N. Frenkel.* The transcription and State of herpes simplex virus DNA in productive infection and in human cervical cancer tissue. *Cancer Res* 33, 1402-1416, 1973.
- *Muñoz, N.* Effect of herpes virus type 2 and hormonal imbalance on the uterine cervix of the mouse. *Cancer Res* 33: 1504-1508, 1973.
- *Gudnadottir, M. H. et al.* Virus isolated from the brain of a case of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 9: 85-95, 1964.
- *Nahmias, A. et al.* Genital herpes simplex infection. Virologic and cytologic studies. *Obstet Gynecol* 29: 395-400, 1967.  
*Z. et al.* Cytology and histopathology of cervical herpes simple infection. *Cancer* 19: 1026-29, 1966.
- *Korolev, AL, E. Bravo.* Infección herpética genital experimental y carcinoma de cuello del útero humano. Estudio en microscopía electrónica. Presentado en III Seminario, CNIC. Dic. 1971.