



## Aspectos ultraestructurales de la infección por VIH-1 en vellosidades placentarias humanas tratadas con zidovudina

Olivar Clemente Castejón-Sandoval,\* Ángela Josmar López-González,\* Oliver Clemente Castejón-Morett\*\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

**Antecedentes:** en pacientes con VIH las vellosidades placentarias normales pueden sufrir cambios degenerativos, las hormonas que mantienen el embarazo (HCG y progesterona) están disminuidas, bajan el pH del plasma y las tensiones de oxígeno.

**Objetivo:** demostrar los cambios ultraestructurales degenerativos en vellosidades placentarias a término de embarazadas infectadas por VIH-1 y tratadas con zidovudina.

**Material y método:** estudio de casos y controles efectuado en el laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, Venezuela. Se analizaron cuatro placentas de embarazadas diagnosticadas con VIH-1, se procesaron tres especímenes de cada placenta con las técnicas de microscopia electrónica convencional. Los resultados se compararon con cuatro casos normales.

**Resultados:** se encontraron partículas de la estructura viral asociadas con las microvellosidades del sincitio y en regiones citoplasmáticas del mismo. Se observaron: interrupciones de la membrana plasmática sincitial, edema del sincitio; pérdida ribosomal del RER, desaparición de mitocondrias, complejo de Golgi, RER, lisosomas y de filamentos citoplasmáticos, disolución de la matriz hialoplásmica, filopodios de la membrana sincitial, heterocromatina nuclear compactada y cisterna perinuclear ampliada. Los macrófagos tenían numerosas partículas en el interior del citoplasma, probablemente pertenecientes al material electrón denso contenido en la nucleocápside viral, que también se observaron en la región del estroma cercana al endotelio de la vellosidad. Se halló cariorrexis en algunos miofibroblastos degenerados del estroma.

**Conclusiones:** los cambios indican que el efecto citopático viral se extiende desde la periferia del sincitio hasta el estroma, y sugiere que la barrera placentaria dañada no está en las mejores condiciones para la transmisión de gases, metabolitos o nutrientes hacia el componente vascular fetal.

**Palabras clave:** vellosidad placentaria, cambios ultraestructurales, VIH.

### ABSTRACT

**Background:** HIV patients with normal placental villi can suffer degenerative changes, the hormones that maintain pregnancy (HCG and progesterone) are diminishing, the pH of blood and oxygen tensions lower.

**Objective:** To demonstrate ultrastructural degenerative changes in placental villi at term of pregnant women infected by HIV-1 with zidovudine treatment.

**Material and method:** Four placentas at term from seropositive mothers were analyzed; three specimens of each one were processed with conventional transmission electron microscopy. The results were compared with four control cases.

**Results:** Particles belonging to the viral structure associated with the microvilli of the syncytium and cytoplasmic regions were found. Were observed: interruptions of syncytial plasma membrane, syncytial edema; loss of ribosomes at level of RER, disappearance of mitochondria, Golgi complex, RER, lysosomes and cytoplasmic filaments, dissolution of hyaloplasmic matrix, filopodiums of syncytial membrane, aggregated nuclear heterochromatin and dilated perinuclear cistern. Macrophages had numerous particles into cytoplasm, probably pertaining to electron dense material contained in the viral nucleocapsid, also observed in the stromal region close to the endothelium of the villus. Some myofibroblasts were detected suffering a process of cellular death with kariorexis event.

**Conclusions:** These changes indicate that the cytopathic effect spreads from peripheral syncytium to stromal zone suggesting that the damaged placental barrier don't have the better conditions for the transmission of gases, nutrients and metabolites toward fetal circulation.

**Key words:** placental villi, ultrastructural changes, HIV.

### RÉSUMÉ

**Antécédents:** chez les patientes avec HIV, les villosités placentaires normales peuvent subir des changements dégénératifs, les hormones qui gardent la grossesse (HCG et progestérone) sont diminuées, abaissent le pH du plasma et les tensions d'oxygène.

**Objectif:** démontrer des changements ultra-structuraux dégénératifs dans des villosités placentaires à terme chez des femmes en état de grossesse infectées par HIV-1 et traitées avec zidovudine.

**Matériel et méthode:** on a analysé quatre placentas de femmes en état de grossesse diagnostiquées avec HIV-1, trois spécimens de chaque placenta ont été traités avec les techniques de microscopie électronique conventionnelle. Les résultats ont été comparés avec quatre cas normaux.

**Résultats:** on a trouvé des particules appartenant à la structure virale associées avec les microvillosités du syncytium et dans des régions cytoplasmiques de celui-ci. On a observé: des interruptions de la membrane plasmique syncytiale, œdème du syncytium; perte ribosomale du RER, disparition de mitochondries, appareil de Golgi, RER, lysosomes et de filaments cytoplasmiques, dissolution de la matrice hyaloplasmique, filopodes de la membrane syncytiale, hétérochromatine nucléaire compactée et citerne périnucléaire amplifiée. Les macrophages avaient de nombreuses particules à l'intérieur du cytoplasme, probablement appartenant au matériel électron dense contenu dans la nucléocapside virale, qui ont été aussi observées dans la région du stroma proche de l'endothélium de la villosité. On a trouvé caryorrhexie dans quelques myofibroblastes dégénérés du stroma.

**Conclusions:** ces changements indiquent que l'effet cytopathique viral s'étend depuis la périphérie du syncytium jusqu'au stroma et suggèrent que la barrière placentaire ainsi endommagée n'est pas dans les meilleures conditions pour le transfert des gaz, des métabolites ou des nutriments vers le composant vasculaire fœtal.

**Mots-clés:** villosité placentaire, changements ultra-structuraux, HIV.

## RESUMO

**Antecedentes:** Em pacientes com HIV as vilosidades placentárias normais podem sofrer mudanças degenerativas, os hormônios que mantêm a gravidez (HCG e progesterona) estão menores, o pH do plasma e as tensões de oxigênio são diminuídos.

**Objetivo:** Demonstrar as mudanças ultra-estruturais degenerativas em vilosidades placentárias a término em grávidas infectadas por HIV-1 e tratadas com zidovudina.

**Material e método:** Foram analisadas quatro placentas de mulheres grávidas diagnosticadas com HIV-1, três espécimes de HIV de cada placenta foram processadas com as técnicas de microscopia eletrônica convencional. Os resultados foram comparados com quatro casos normais.

**Resultados:** Foram encontrados partículas pertencentes a estrutura viral associadas com as micro vilosidades do sincício e em regiões citoplasmáticas do mesmo. Foram observadas interrupções da membrana plasmática sincicial, edema do sincício, perda ribossomo do RER, desaparecimento de mitocôndrias, complexo de Golgi, RER, lisossomos e de filamentos citoplasmáticos, dissolução da matriz citoplasmática, filopódios da membrana sincicial, heterocromatina nuclear compactada e cisterna perinuclear ampliada. Os macrófagos tinham numerosas partículas no interior do citoplasma, provavelmente pertencentes ao material elétron denso contido na nucléocapsídeo viral, que também foram observados na região do estroma perto do endotélio da vilosidade. Encontraram cariorréxis em alguns miofibroblastos degenerados do estroma.

**Conclusões:** Essas mudanças indicam que o efeito citopático viral se estende desde a periferia do sincício até o estroma, e assim sugere que a barreira placentária machucada não está nas melhores condições para a transmissão de gases, metabolitos ou nutrientes até o componente vascular fetal.

**Palavras-chave:** Vilosidade placentária, mudanças ultra-estruturais, HIV.

El VIH-1 es un retrovirus no oncogénico con gran poder citolítico, que infecta y destruye la población de linfocitos TCD4, y llega a la placenta mediante transmisión materno-fetal desde el útero infectado, durante el embarazo o en el parto.<sup>1</sup> Las vellosidades placentarias en estado normal, no afectadas por procesos virales, tienen

membranas basales delgadas, grandes células citotrofoblásticas raramente observadas durante el tercer trimestre del embarazo y que pueden sufrir necrosis trofoblástica. El trofoblasto no sufre hiperplasia, no hay corangiosis y la fibrina intervillosa está ausente y, en general, los linfocitos maternos no se adhieren al trofoblasto.<sup>2</sup>

\* Laboratorio de Microscopia Electrónica.

\*\* Estudiante de quinto año de Medicina. Pasante del Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua. Centro de Investigación y Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua (CIADANA). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo, sede Aragua. Estado de Aragua, Maracay, Venezuela.

Correspondencia: Prof. Olivar C Castejón. Coordinador General del CIADANA, Profesor titular de Biología Celular. Facultad de Ciencias

de la Salud, Universidad de Carabobo, sede Aragua. Estado de Aragua, Maracay, Venezuela. Apartado 4944. Correo electrónico: olivar.ciadanauc@gmail.com Recibido: agosto, 2009. Aprobado: mayo, 2010.

Este artículo debe citarse como: Castejón-Sandoval OC, López-González AJ, Castejón-Morett OC. Aspectos ultraestructurales de la infección por VIH-1 en vellosidades placentarias humanas tratadas con zidovudina. Ginecol Obstet Mex 2010;78(7):335-344.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

En casos de infección por VIH (donde las hormonas que mantienen el embarazo, como la HCG y la progesterona, están disminuidas,<sup>3</sup> baja el pH del plasma y las tensiones de oxígeno)<sup>4</sup> las vellosidades normales pueden sufrir cambios degenerativos que pueden confirmarse por microscopia electrónica de transmisión. Se observan membranas basales gruesas impregnadas de depósitos de calcio en vellosidades infectadas por VIH-1.<sup>5</sup>

También se observa que las células citotrofoblásticas proliferan y se descaman, el trofoblasto sufre necrosis, el citotrofoblasto muestra hiperplasia, la fibrina intervellosa puede o no estar calcificada, hay corangiosis y los linfocitos maternos se adhieren a las vellosidades.<sup>6</sup>

Más recientemente, en placentas normales se reportaron nódulos sincitiales en un rango de 7 a 30%; de fibrinoide hasta 10%, edema que no supera 3%, fibrosis estromal hasta 10% y fibrina intervellosa en 13%.<sup>7</sup> Cuando las vellosidades de esas placentas normales se encuentran infectadas por VIH-1 el espacio intervellosa se altera y hay, por ejemplo, 56% de trombosis intervellosa con respecto a las normales que indicaron 3%. Esta alteración provoca cambios en los vasos de las vellosidades que muestran 100% de cambios degenerativos vasculares al compararse con las vellosidades normales (39%).<sup>8</sup>

El espectro de lesiones patológicas por VIH-1 en la placenta no está bien documentado. Al comparar casos con zidovudina y sin ella no hay lesiones generales significativas y el disco placentario no mostró decrecimiento significativo en sus dimensiones.<sup>9</sup>

No hay diferencias histopatológicas significativas entre placentas trasmisoras y no trasmisoras del VIH-1.<sup>3</sup> En numerosas placentas examinadas no se notaron cambios degenerativos provocados por el VIH-1,<sup>10</sup> donde la placenta se comporta como una verdadera barrera ante el ataque viral resistiéndose al poder citolítico de los virus, sin respuesta inflamatoria ni lesión placentaria alguna.

La inflamación de vellosidades es mucho más frecuente en placentas de embarazadas con bajo nivel socioeconómico que las de clase media,<sup>11</sup> lo que indica que los factores socioeconómicos pudieran influir en la infección placentaria.

El propósito de este estudio es demostrar los cambios ultraestructurales degenerativos en las vellosidades placentarias a término infectadas por VIH-1 y tratadas con zidovudina.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron dos grupos de placentas. El grupo de estudio de cuatro placentas procedentes de una institución hospitalaria que atiende embarazadas de bajos recursos socioeconómicos, cuya circunstancia dificulta el seguimiento y posterior evaluación de los recién nacidos, con edad gestacional entre 38 y 40 semanas de embarazo. Tres casos recibieron el esquema de tratamiento antirretroviral según protocolo del grupo de ensayos clínicos del SIDA pediátrico, PACTG 076,<sup>12</sup> siguieron el tratamiento y administración de 3'-azido-3'-desoxitimidina (zidovudina) según Connor y col.,<sup>13</sup> que iniciaron durante el tercer trimestre del embarazo en dos embarazadas y uno durante el segundo trimestre.

El cuarto caso corresponde a una mujer con tratamiento de VIH, que detectó su embarazo a las seis semanas y conoció los riesgos de la administración de la zidovudina en ese periodo. Los pesos placentarios variaron entre 500 y 546 g. Los pesos de los recién nacidos por cesárea fueron entre 3,050 y 3,300 g.

La serología de las embarazadas fue negativa para hepatitis B, C, citomegalovirus, virus Epstein Barr, rubéola y toxoplasmosis. Sin ninguna otra enfermedad metabólica, genética o parasitaria, con nacidos vivos, sin evidencia de malformación y seronegativos a las seis semanas del nacimiento.

El grupo control se compuso de cuatro placentas de embarazadas con VIH negativas de similar condición económica, edad y peso, que parieron por parto vaginal y dieron pesos de recién nacidos apropiados para la edad gestacional. Las vellosidades de este grupo control se estudiaron previamente,<sup>7</sup> de placentas sanas de embarazadas normales que dieron recién nacidos sanos y sus características se describieron para determinar la proporción de alteraciones posibles. Hubo 4% de congestión vascular y 2% de calcificación intraluminal en vellosidades de placentas normales.<sup>8</sup> Los pesos placentarios fueron entre 560 y 600 g. Los pesos de recién nacidos fueron entre 3,200 y 3,400 g.

A las embarazadas infectadas con VIH-1 se les dio a conocer el consentimiento informado y la aprobación del comité de ética de la institución hospitalaria para la realización de la investigación, según la declaración de Helsinki. Las embarazadas fueron diagnosticadas por ensayo de Micro-Elisa de cuarta generación, con equipo

automatizado AXSYM (Abbot, EUA) y test confirmatorio Western Blot Assay HIV Blot 2.2 de MP Diagnostics (Germany-Singapore Science Park).

Las cargas virales de las embarazadas estuvieron por debajo de 1,000 copias/mL de plasma, de acuerdo con la técnica de reacción en cadena de polimerasa de la transcriptasa inversa conocida como PCR o RT-PCR. Como cada virus lleva dos copias de ARN si se encontraron 2,000 copias de ARN del VIH, según esta técnica, el número de copias por mL fue de 1,000.

De cada una de las placentas se tomaron tres pequeños especímenes de la superficie materna, seleccionados al azar, de la región central parabasal en el plano vertical. Las muestras fueron disecadas en biopsias de 2 a 5 mm de grosor, 3 por cada pequeño espécimen, 72 biopsias en total, que se cortaron, lavaron y fijaron inmediatamente en una solución compuesta de 4% paraformaldehído y 2% de glutaraldehído en buffer cacodilato 0.1 M a 4 °C y pH 7.4.

Las biopsias se dividieron en fragmentos de 1 mm y se sumergieron en solución fresca fijadora por periodos variables de 2 a 72 horas, seguidos por una fijación secundaria en tetraóxido de osmio al 1% en agua destilada durante 1 hora.<sup>14</sup> Después de la deshidratación en una serie creciente de alcoholes y de óxido de propileno, los tejidos se incluyeron en Araldita 502 (Ladd Research Industries INC, Burlington, Vermont).

Las secciones analizadas para estudio se seleccionaron perpendiculares a la superficie del trofoblasto o eje longitudinal de la vellosidad clasificada como terminal, en la cual se realiza el intercambio de gases y nutrientes. De cada uno de los bloques de araldita se hicieron los cortes gruesos de 1 µm, teñidos con azul de toluidina para la orientación topográfica con microscopía de luz.

En un ultramicrotomo Porter Blum MT-2 (Ivan Sorvall Inc, Norwalk, Connecticut, USA), equipado con cuchilla de diamante y coleccionadas sobre rejillas de cobre, se obtuvieron secciones delgadas. Dos rejillas por cada bloque se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con el microscopio Phillips CM 200 (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands).

Las secciones ultrafinas se observaron a 80 Kv con aperturas de 50 µm en el objetivo y con una magnificación de 6,000 X a 150,000 X. Las microfotografías electrónicas se seleccionaron y compararon con las del grupo control, en más de 60 de ellas se examinó la ultraestructura de zonas de la vellosidad placentaria afectada por el VIH-1.

Los resultados se obtienen no siguiendo el inicio del tratamiento sino buscando si la organización del tejido placentario está desorganizada, dañada, sin estructuras o si están interrumpidas por el antirretroviral y los virus, identificándolas a nivel ultraestructural.

Todas las muestras las observaron dos investigadores con igual conocimiento del historial clínico, la misma habilidad para el diagnóstico de lesiones, con el mismo protocolo de observación e igual número de láminas observadas; con el mismo criterio sobre los conceptos de la bibliografía obtenida de las mismas referencias, considerando el mismo vocabulario a manera de disminuir la discrepancia intra e interobservador en el diagnóstico de las lesiones, que se observaron al mismo tiempo para discutir las en mutuo acuerdo.

Se seleccionaron microfotografías para mostrar las regiones de la vellosidad placentaria afectadas por el VIH-1 localizadas en la periferia trofoblástica, o en el contenido celular de las diferentes células observadas en el estroma de la vellosidad.

## RESULTADOS

Algunas regiones del sincitiotrofoblasto tenían láminas paralelas de retículo endoplásmico rugoso, que conservan los ribosomas asociados con sus membranas y con cisternas relativamente normales sin cambios que expresaran edema (Figura 1).

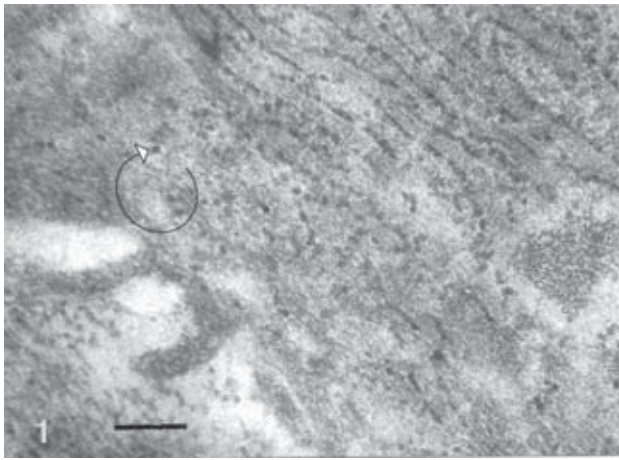
Otras observaciones demostraron desgranulación del retículo endoplásmico rugoso mientras que los controles tuvieron al retículo endoplásmico rugoso sin la pérdida de ribosomas. Las cisternas conservan la disposición paralela con un contenido subcisternal gránulo-filamentoso y buena disposición de los ribosomas sobre las membranas del retículo endoplásmico rugoso. La superficie del sincitiotrofoblasto muestra partículas electrón densas de tamaño variable asociadas con la membrana plasmática del sincitio, que semejan ser partículas electrón densas procedentes del material contenido en la nucleocápside del VIH-1 (Figura 2).

Cuando se compara esta superficie con la normal no aparecen estos cuerpos oscuros; por el contrario, se nota una matriz hialoplásmica mucho más clara y los únicos cuerpos oscuros que se observan corresponden a pequeños gránulos secretorios y ribosomas libres que son normales en la matriz hialoplásmica. Los microfilamentos citoplas-

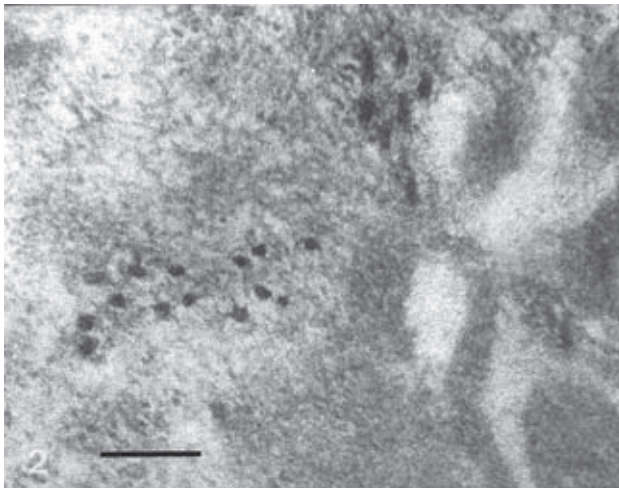


máticos se asocian con la membrana plasmática, la cual tiene vesículas de endocitosis.

Las zonas citoplasmáticas del sincitio exhiben áreas de lisis o desaparición de organelos como: mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, regiones del complejo de Golgi o lisosomas. La región nuclear mostró la heterocromatina compactada y cisterna perinuclear ampliada. Los largos



**Figura 1.** En esta región de citoplasma del sincitio, las partículas provenientes de virus (flecha) pueden confundirse con los ribosomas del RER, el cual se observa sin cambios degenerativos. Hacia el lado derecho se observa una zona túbulo reticular perteneciente al retículo endoplásmico liso. Barra: 200 nm.



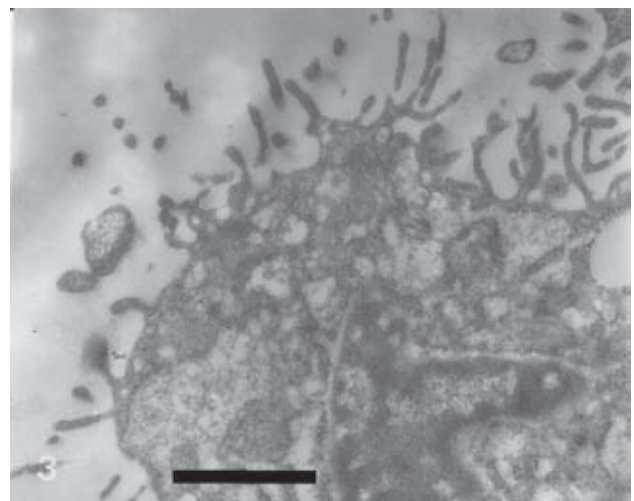
**Figura 2.** Partículas de viriones de VIH en relación con la membrana plasmática del sincitio; otras ya están incluidas en el citoplasma sincitial en relación con una intrincada trama gránulo-filamentosa, donde los organelos parecen haber desaparecido. Barra: 200 nm.

filopodios de la membrana plasmática recuerdan al trofoblasto en hipoxia durante la isquemia tisular (Figura 3).

Las mismas zonas del control mostraron una estructura mejor organizada con organelos intactos, gránulos secretorios y microvellosidades de la membrana celular escasas y no tan alargadas, como las afectadas por VIH. Las mitocondrias se observan bien con sus crestas mitocondriales. Cuando se observa la ultraestructura por debajo de la membrana plasmática del sincitio se encuentran restos de organelos y ampliadas cisternas del retículo endoplásmico rugoso, que han perdido sus ribosomas, lo que da una imagen vacuolar o de edema intracitoplasmático (Figura 4).

Debajo de la membrana plasmática, en el control, se observó una panorámica ultraestructural con buena organización del retículo endoplásmico rugoso (RER), retículo endoplásmico liso (REL), mitocondrias que permanecen con sus crestas y matriz hialoplásmica no tan oscura como la vista con VIH. En otras observaciones, la zona que correspondía a las membranas de las subcisternas del retículo endoplásmico rugoso estaba interrumpida y la cisterna ampliamente dilatada, repleta de un material gránulo-filamentoso (Figura 5).

En el control los espacios subcisternales del RER han conservado su amplitud normal, mientras que las afectadas por VIH ya casi tienen un aspecto vacuolar en un fondo oscuro gránulo filamentoso.

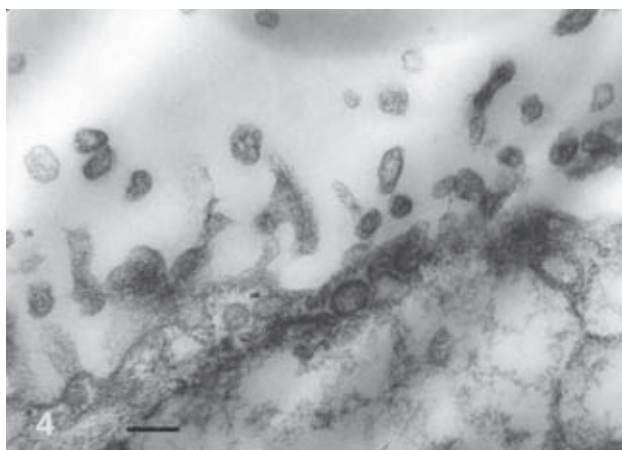


**Figura 3.** Región de sincitio que muestra marcados cambios citoplasmáticos degenerativos, donde la matriz hialoplásmica no muestra organelos bien organizados. Barra: 1 µm.

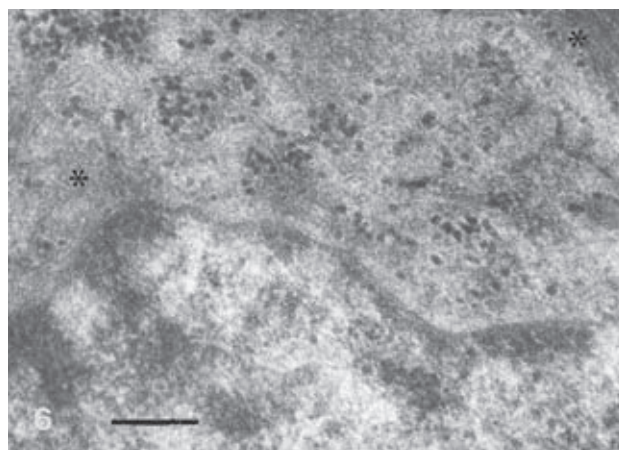
Al analizar el componente estromal de la vellosidad, las células de Hofbauer mostraron partículas internalizadas en el citoplasma que provienen del material contenido en la nucleocápside del virus, dispersas en la matriz hialoplásmica, que muestra también numerosas proteínas fibrilares inmersas en ella. (Figura 6).

En las imágenes de control, las células de Hofbauer no mostraron estas partículas ni tampoco la gran cantidad de

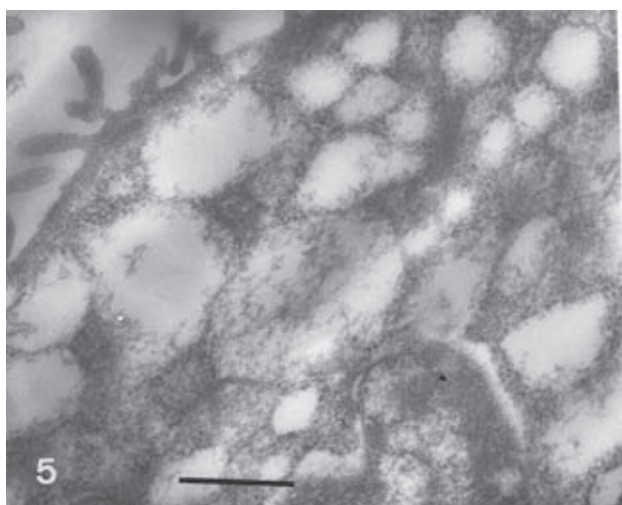
microfilamentos citoplasmáticos que oscurecen la matriz hialoplásmica. La cantidad disminuida de microfilamentos en el control exhibe una imagen más clara de la matriz. Se observan miofibroblastos con acentuados cambios degenerativos y en estado avanzado de necrosis celular, cuya cariorexis pudo notarse (Figura 7). La matriz hialoplásmica de éstos contenía numerosas partículas electrón densas dispersas, y semejaban partículas procedentes de virus.



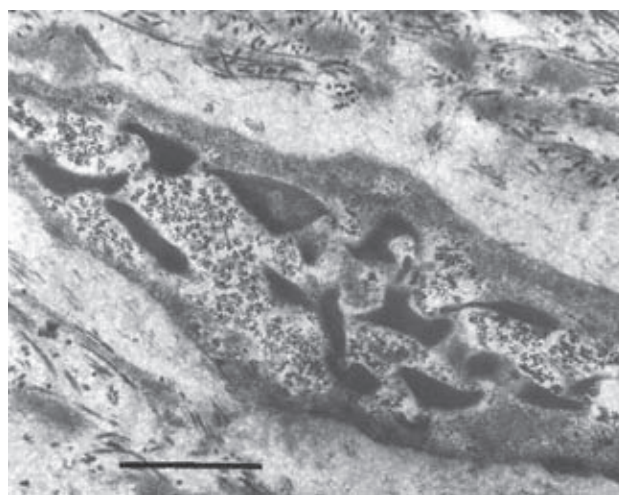
**Figura 4.** La superficie sincitial muestra vestigios de organelos en una región donde hubo, *in vivo*, una extensa infiltración de líquidos o edema que desorganizó la estructura citoplasmática. Barra: 200 nm.



**Figura 6.** Una región de célula de Hofbauer muestra numerosas partículas virales distribuidas en el citoplasma. Los asteriscos indican zonas de acumulación de filamentos citoplasmáticos. Barra: 200 nm.



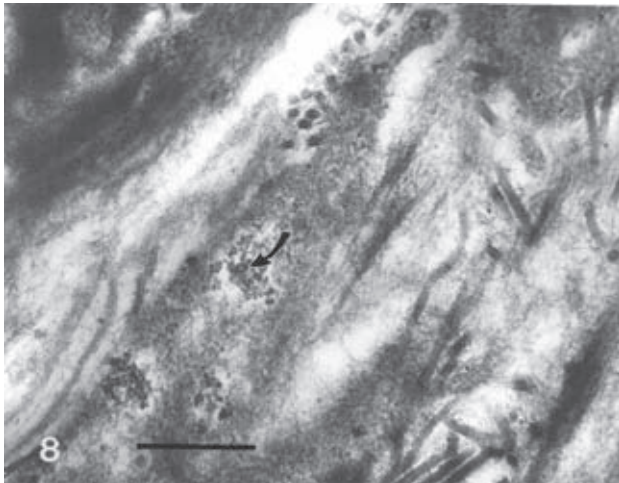
**Figura 5.** La imagen de la región del sincitio es completamente vacuolar y la subcisterna, en el centro de la microfotografía del RER, muestra un material gránulo-filamentoso. Barra: 500 nm.



**Figura 7.** Región estromal que muestra miofibroblasto con fragmentación nuclear en acentuado cambio degenerativo. Entre restos nucleares se notan las numerosas partículas de virus. Barra: 1µm.

Las imágenes del control mostraron miofibroblastos con un núcleo grande, con ligeras indentaciones en la superficie, bajo la cual se observan franjas de heterocromatina asociada con la membrana nuclear externa y una matriz nucleoplásmica granular. Este núcleo se rodea de poco citoplasma con cortas pero ramificadas prolongaciones de citoplasma que se entremezclan con regiones claras de matriz extracelular donde pueden encontrarse prolongaciones de otros miofibroblastos. Este citoplasma contiene miofilamentos similares a la  $\alpha$ -actinina de la fibra muscular lisa.

En el estroma de la vellosidad cercana a la zona endotelial se notaron las partículas virales. En numerosas fibras de colágeno también se observaron estas partículas (Figura 8) dispuestas en conglomerados dispersos.



**Figura 8.** Región estromal de la vellosidad con zonas que exhiben un conglomerado de partículas (flecha), probablemente de naturaleza viral asociadas con fibrillas de colágeno. Barra: 500 nm.

En otras ocasiones las partículas entre 25 y 50 nm de diámetro se muestran íntimamente asociadas con las fibrillas de colágeno. En ocasiones los vasos del estroma mostraron las mismas partículas. En el control no pudo observarse la concentración de partículas en la matriz extracelular collagenosa, solamente se notan los cortes transversales de fibrillas de colágeno. El resto de la imagen del control está constituida por una matriz extracelular de muy baja densidad electrónica donde se localizan partículas de los cortes transversales de microfibrillas que componen a las fibrillas de colágeno.

## DISCUSIÓN

En esta investigación se demostraron los cambios ultraestructurales degenerativos en las vellosidades placentarias afectadas por VIH-1, tomadas de mujeres embarazadas contaminadas y con profilaxis de zidovudina. Estas observaciones, realizadas con microscopia electrónica de transmisión en vellosidades terminales, indican que la placenta puede ser lesionada y variar su comportamiento fisiológico con la infección por VIH-1.

Nuestros resultados demuestran la existencia de partículas virales en el sincitio cuya ultraestructura no ha sido todavía totalmente vulnerada, mientras que en otras regiones del mismo se observa severamente afectada. Hasta la fecha, la captación de estas partículas por el trofoblasto no se ha aclarado totalmente.<sup>2</sup> Quizá el contacto de células linfomononucleares infectadas, en el espacio intervilloso sanguíneo materno con el sincitio, provoca la liberación de virus que pudieran ser internalizadas mediante micropinocitosis con participación de filamentos de actina.<sup>15</sup> Resultados que difieren de los reportados por Tscherning-Casper y col.,<sup>16</sup> quienes sostienen que las placentas no se infectan, permanecen histológicamente normales y resultan negativas al VIH por inmunocitoquímica y PCR cuando son tratadas con zidovudina.

Las interrupciones a nivel de membrana plasmática, probablemente provocadas por el virus, pudieran estar originando cambios en la permeabilidad del agua y producir el ingreso violento de líquidos con la expresión de edema visualizado en las Figuras 4 y 6.

En estudios de plaquetas infectadas por VIH se han encontrado —con técnicas de microscopia electrónica de barrido— membranas celulares rotas.<sup>17</sup> No debe extrañarnos que la actividad viral haya dañado el sistema de acuoporinas<sup>18</sup> de las membranas del sincitio, observándose el efecto aquí mostrado.

Villegas y col.<sup>5</sup> reportaron, en su estudio ultraestructural de placentas seropositivadas para VIH, un sincitio con citoplasma muy vacuolado, con partículas similares a retrovirus y RER prominente. Así mismo, encontraron células de Hofbauer hipertrofiadas e hiperplásicas. Con el microscopio electrónico, la mayor parte de las placentas en dicho trabajo mostraron microvellosidades del sincitio normales a diferencia de las aquí reportadas como muy alargadas, que sugieren células que sufren hipoxia por isquemia.<sup>19</sup> Ellos describieron que las infecciones por VIH



no ocasionan vellositis o necrosis, y que al infectarse el sincitio éste permanece como reservorio de virus y se vuelve una barrera efectiva al paso de virus hacia el estroma, ya que el sincitio no tiene capacidad para replicarse.

Al respecto, Vidricaire y col.<sup>20</sup> con microscopia de barrido láser confocal, y un Fluoview FV 300, con trofoblastos polarizados en cultivos celulares, determinó la existencia de un evento de reciclaje del VIH-1 consistente en que una vez internalizados los virus por endocitosis desde la superficie apical del trofoblasto, éstos se dirigen a la membrana basal y desde ahí rebotan hacia la misma, denominando a este último reciclaje como si el sincitio estuviese rechazando la entrada de los virus.

El hallazgo en nuestros resultados de partículas que sugieren pertenecer al VIH en el estroma indicaría lo contrario. Con respecto a la confirmación de que las partículas observadas en el espacio intervelloso asociadas con fibras de colágeno sean realmente pertenecientes a VIH-1, se requieren posteriores estudios con técnicas de PCR y tejido fresco fijado en glutaraldehído asociados con estas técnicas de microscopia electrónica de transmisión para mostrar, a mayor resolución, la identidad del virus a nivel del estroma. Este evento parece estar apoyado por la existencia de receptores CD4 en el estroma de la vellosidad.<sup>21</sup>

En un estudio posterior de Villegas y col.,<sup>22</sup> que compara placentas con y sin tratamiento antirretroviral con zidovudina y 2'3' dideoxiadenosina (ddI), con microscopia electrónica de transmisión e inmunocitoquímica ultraestructural, con gránulos de oro coloidal, no se encontraron partículas virales en 4 de los 18 casos. Las partículas virales fueron vistas entre microvellosidades del sincitio, en el citoplasma sincitial, macrófagos, endotelios de vellosidades y células deciduales. Cuatro casos tratados con zidovudina no mostraron partículas virales y la inmunocitoquímica con oro coloidal mostró la síntesis de proteínas virales en el sincitio y endotelio de capilares fetales. En los casos que no pudieron ver los virus no se puede negar la acción de los antirretrovirales utilizados.

A diferencia de lo reportado en este estudio, en el que las partículas virales se observaron en la periferia de la vellosidad y en el estroma. Esto quiere decir que los virus han dañado, en parte, la barrera placentaria en los casos aquí comunicados, lo que provoca trastornos en la transferencia de nutrientes, lo que podría haber generado una disminución en el peso fetal.

Los cambios degenerativos observados en las vellosidades pueden ser producto del efecto citopático viral, de la actividad farmacológica de la zidovudina o de la combinación de ambos.

Las microfotografías de este trabajo no muestran la preservación de mitocondrias. Es posible que la zidovudina, al igual que lo observado en miocardiocitos de ratas, haya producido el edema de las mitocondrias desapareciendo posteriormente éstas del citoplasma.<sup>23</sup> La desaparición de éstas ha podido, en consecuencia, provocar la desaparición de otros organelos subcelulares. Además, en medio de cultivos altera el metabolismo enzimático de las células placentarias, su proliferación e inicia la apoptosis.<sup>24</sup> No sabemos si lo encontrado en la Figura 7 es producto de esta actividad o de la acción viral. Anteriormente hemos descrito cómo la interacción del virus con la membrana plasmática sincitial pudiera provocar edema desorganizando la ultraestructura celular.

Hemos interpretado que la zidovudina pudiera dañar la maquinaria del sistema de respiración celular organizado en las mitocondrias del trofoblasto, como se ha descrito.<sup>25</sup> Esto provoca que las células no tengan la energía suficiente para realizar su metabolismo y terminen en muerte celular, previamente desorganizando su ultraestructura. El virus, en la interacción con las membranas del trofoblasto durante su penetración, probablemente daña la capa bilipídica de la membrana celular dejando interrupciones que facilitan la entrada de plasma intervelloso que violentamente desorganizará la ultraestructura mediante edema celular. Así, los virus pueden penetrar hasta el estroma o a través de hendiduras del trofoblasto o de verdaderos canales transtrofoblásticos que existen en el sincitiotrofoblasto.<sup>2</sup> Las células de Hofbauer absorben los virus al llegar a éstas y terminan por morir. La vellosidad se queda sin su defensa celular y tiende a degenerar. Los virus pueden entrar asociados con corrientes de plasma intervelloso que originan edema celular en la desorganización de la ultraestructura celular.

En este tipo de trabajo es imposible conocer si lo observado es producto de la combinación de estos dos factores. Puede ser que en nuestras observaciones la transmisión viral hacia el estroma vellositario bajo tratamiento con zidovudina se debe a precarias condiciones de salud, sistema inmunitario materno con baja capacidad de respuesta, embarazadas con pobre control obstétrico debido a su procedencia familiar de bajos recursos económicos.



Se han enumerado más de 30 factores que intervienen en la transmisión materno-fetal del VIH, muchos de ellos todavía no bien aclarados.<sup>12</sup> La transmisión materno-fetal del VIH es sumamente compleja y sobrepasa los límites de este trabajo. Las complejas regulaciones que dentro de la placenta llevan a una infección o impiden la misma requieren de posterior y urgente investigación. Estos cambios ultraestructurales disminuyen la capacidad de la placenta de transmitir nutrientes, lo que provoca restricción del crecimiento uterino, como se deduce de la baja relación de peso fetal y peso placentario<sup>26</sup> formándose prematuros de bajo peso y pequeños para la edad gestacional.

El tratamiento con antirretrovirales durante el embarazo tiene riesgos y la zidovudina no es la excepción. Después de realizado el estudio se recibió la noticia de la muerte neonatal en uno de los casos aquí descritos. No se pudo confirmar a cuál placenta perteneció. Probablemente el cuarto caso que recibía tratamiento antes de salir embarazada haya tenido un efecto teratogénico al recibir tratamiento en el primer trimestre del embarazo. No sabemos si todos estos cambios observados pudieran evitarse, muy probablemente, con zidovudina en combinación con otros retrovirales, como se ha sugerido.<sup>12</sup> No obstante, la zidovudina, sola<sup>13</sup> o combinada con otros antirretrovirales,<sup>27</sup> reduce notablemente la transmisión perinatal del VIH.<sup>12</sup>

## CONCLUSIONES

El efecto citopático viral asociado con la zidovudina se observa desde la periferia de la vellosidad hacia la región estromal; se manifiesta con cambios ultraestructurales degenerativos, en embarazadas tratadas con zidovudina, a nivel del trofoblasto y células estromales, lo que sugiere que parte de la barrera placentaria no está en las mejores condiciones para la transferencia de gases, nutrientes y metabolitos hacia la circulación vascular fetal.

## Agradecimientos

A la Coordinación Administrativa de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, sede Aragua, por el fondo fijo institucional para el CIADANA. A la Dra. Alba E Rivas por la obtención del material placentario en el servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Central de Maracay. A los doctores Gilberto Sánchez y Raúl Padrón del Laboratorio de Biología Estructural del

IVIC-Caracas por facilitar la infraestructura de microscopía electrónica con el uso del crio-microscopio electrónico de transmisión Phillips CM200. A la TSU Laury Rosely de Ovalles, por transcribir el manuscrito.

## REFERENCIAS

1. Melero MJ. Síndromes de inmunodeficiencia. En: Argente HA, Álvarez ME, editores. 1ª ed. *Semiología Médica. Fisiopatología, semiología y propedéutica. Enseñanza basada en el paciente*. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2006;p:1145-1152.
2. Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2000.
3. Miller RK, Ebbesen P, Popek EJ, Polliotti B, et al. The role of the placenta in the vertical transmission of HIV and other infectious agents. A Workshop Report. *Trophoblast Research* 1998;12:225-235.
4. Ebbesen P, Toth F, Aboagye MG, Zachar B, et al. Vertical transmission of HIV: possible mechanisms and placental responses. *Trophoblast Research* 1994;8:1-17.
5. Villegas CH, Carrillo FJ, Paredes Y, Banon A, Karchmer KS. Estudio ultraestructural de placentas en mujeres seropositivas para el VIH. *Ginecol Obstet Mex* 1994;62:136-142.
6. Anderson VM, Zevallos E, Gu J. The HIV exposed placenta. Morphologic observations and interpretation. A review. *Trophoblast Research* 1994;8:47-65.
7. Castejón SOC, López GAJ, Pérez YLM, Castejón MOC. Presencia de alteraciones histopatológicas en vellosidades placentarias normales en Maracay (Venezuela). *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2009;60:237-246.
8. Castejón SOC, López GAJ, Pérez YLM, Castejón MOC y col. Alteraciones morfológicas en el espacio intervilloso y en los vasos de vellosidades troncales de embarazadas infectadas con VIH-1 tratadas con zidovudina. *Rev Elect Portales Medicos.com* 2009;4:442.
9. D'costa GF, Khadke K, Patil YV. Pathology of placenta in HIV infection. *Indian J Pathol Microbiol* 2007;50:515-519.
10. Jauniaux E, Nessmann C, Imbert MC, Meuris S, et al. Morphological aspects of the placentas of HIV pregnancies. *Placenta* 1988;9:633-642.
11. Loga EM, Driscoll SG, Munro HN. Comparison of placentae from two socioeconomic groups. I. Morphometry. *Pediatrics* 1972;50:24-31.
12. Bulterys M. HIV during pregnancy. Preventing vertical HIV transmission in the year 2000: Progress and Prospects. A review. *Trophoblast Research* 2001;15:S5-S12.
13. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med* 1994;331:1173-1180.
14. Glauert AM. *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1987.
15. Vidricaire G, Tremblay MJ. A clathrin, caveolae and dynamin-independent endocytic pathway requiring free membrane cholesterol drives HIV-1 internalization and infection in polarized trophoblastic cells. *J Mol Biol* 2007;368:1267-1283.

16. Tscherning-Casper C, Papadogiannakis N, Anvret M, Stolpe L, et al. The trophoblastic epithelial barrier is not infected in full-term placentae of human immunodeficiency virus seropositive mothers undergoing antiretroviral therapy. *J Virol* 1999;73:9673-9678.
17. Pretorius E, Oberholzer HM, Smit E, Esteyn E, et al. Ultrastructural changes in platelet aggregates of HIV patients: a scanning electron microscopy study. *Ultrastruct Pathol* 2008; 32:75-79.
18. Castejón OC, Ali SK, Canache CL. El edema de la vellosidad placentaria en los casos de muerte fetal. *Gac Med Caracas* 2006;114:291-299.
19. Bachmaier N, Linnemann K, May K, Warzok R, et al. Ultrastructure of human placental tissue after 6h of normoxic and hypoxic dual in vitro placental perfusion. *Placenta* 2007;28:861-867.
20. Vidricaire G, Imbeault M, Tremblay MJ. Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *J Virol* 2004;78:11904-11915.
21. Maury W, Pott BS, Pabson AB. HIV-1 infection of first trimester and term human placental tissue. A possible mode of maternal fetus transmission. *J Infect Dis* 1989;160:583-588.
22. Villegas CH, Paredes VY, Flores RE, Arredondo GJL, Gorbea RM. Estudio comparativo de la placenta de madres seropositivas a VIH. Análisis ultraestructural. *Ginecol Obstet Mex* 1996;64:167-176.
23. Ruga E, Bova S, Nussdorfer G, Mazzocchi G, et al. Zidovudine induced alterations in the heart and vascular smooth muscle of the rat. *Cardiovascular Res* 2003;15:147-155.
24. Collier AC, Hellinwell RJ, Keelan JA, Paxton JW, et al. 3'-azido- 3' deoxythymidine (AZT) induces apoptosis and alters metabolic enzyme activity in human placenta. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;192:164-173.
25. Blanche S, Tardien M, Rustin P, Slama A, et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antirretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 1999;354:1084-1089.
26. Gichangi PB, Nyongo AO, Temmerman M. Pregnancy outcome and placental weights: Their relationship to HIV-1 infection. *East Afr Med J* 1993;70:85-89.
27. Bryson YJ, Mirochnick M, Stek A, Mofenson LM, et al. Pharmacokinetics and safety of nelfinavir when used in combination with zidovudine and lamivudine in HIV-infected pregnant women: Pediatric AIDS Clinical Trials Group (PACTG) Protocol 353. *HIV Clin Trials* 2008;9:115-125.