

Aspectos ultraestructurales de las lesiones producidas por *Mycobacterium spp* en el SIDA.

David Parada, Eduardo Caleiras, Samaris Estrada, Rafael Tovar y Jorge García-Tamayo.

Unidad de Investigación en Patología Ultraestructural y Biología Molecular, Instituto Anatomopatológico, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Micobacterias, ultraestructura, SIDA, necrosis, macrófagos.

Resumen. Se estudiaron con el microscopio electrónico muestras de lesiones necrotizantes en ocho casos de enfermos con SIDA autopsiados y seleccionados entre 35 casos con infección por *Mycobacterium spp*, los cuales forman parte de 230 casos de autopsias en pacientes con SIDA realizadas entre 1984 y 1995 en el Instituto Anatomopatológico de la Universidad Central de Venezuela. Se señalan diversos aspectos sobre la ultraestructura de las micobacterias y sobre las alteraciones que provocan en los tejidos ante el déficit inmunológico que tienen dichos enfermos.

Ultrastructural aspects of the lesions induced by *Mycobacterium spp* in AIDS.

Invest Clín 1998; 39(3): 189-198.

Key words: *Mycobacterium*, ultrastructure, AIDS, necrosis. macrophages.

Abstract. Samples from necrotizing lesions in eight autopsy cases of AIDS were examined with transmission electron microscopy. They were selected among 35 autopsies of *Mycobacterium spp* infection and AIDS, and were part of a series of 230 autopsy cases of AIDS performed from 1984 to 1995 in the Anatomopathologic Institute at Central University of Venezuela. Ultrastructural aspects of micobacteriae, their relationship with macrophages and tissue alterations are discussed and related to the immune deficit observed in AIDS patients.

Recibido: 30-1-97. Aceptado: 29-4-98.

INTRODUCCIÓN

Entre los gérmenes oportunistas que afectan a los pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y cuya patología puede ser proteiforme por las extensas necrosis que provoca, están las micobacterias (1, 2, 3, 4, 5, 6). A pesar de que las infecciones por micobacterias en los pacientes con SIDA se han relacionado principalmente con el llamado complejo de *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC) (4), desde hace muchos años se ha señalado un incremento de la tuberculosis en el SIDA (7, 8, 9), no obstante, nosotros preferimos hablar de infecciones con *Mycobacterium spp*, ya que en nuestro material de autopsias, no podemos precisar, con las coloraciones para bacilos ácido-alcohol resistentes ni con el microscopio electrónico de transmisión (MET), si estas micobacterias son de las especies *tuberculosis*, *avium-intracellulare*, *kansasii*, u otras (1, 2, 3).

En los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la disfunción y depleción de las células T CD4 induce la reactivación de focos granulomatosos que albergan micobacterias y como consecuencia, detectamos la presencia de *Mycobacterium spp* en un alto porcentaje de nuestros enfermos de SIDA (1, 2, 3). Este trabajo analiza algunos aspectos ultraestructurales de las alteraciones provocadas por *Mycobacterium spp* revisadas a través del estudio de la histopatología en más de 35 casos de infecciones con micobacterias y de

las observaciones hechas con el microscopio electrónico de transmisión (MET) en ocho casos de pacientes autopsiados por SIDA, en quienes las lesiones necrotizantes sistémicas inducidas por las micobacterias provocaron la muerte.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio histopatológico de los 35 casos de SIDA e infección por micobacterias fue realizado en material de autopsias con evidencias de *Mycobacterium spp* entre los 230 casos de muertes por SIDA autopsiados y examinados en el Instituto Anatomopatológico, de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela (IAP-UCV) desde el año 1984 hasta 1995. El tiempo *post-mortem* varió de 3 a 35 horas. El material que se fijó en formol al 10%, en muchos casos esta formalina estaba tamponada con buffer fosfato o cacodilato a pH 7,2. Los tejidos se deshidrataron en alcoholes a concentraciones crecientes y se incluyeron en parafina. Los cortes, de dos a cuatro micras de espesor, se tiñeron con hematoxilina-eosina y posteriormente con Zhiel-Neelsen para demostrar la presencia de las bacterias ácido-alcohol resistentes.

Para el estudio ultraestructural utilizamos el material proveniente de ocho autopsias seleccionadas entre los 35 casos de infecciones con *Mycobacterium spp*. Estas muestras, en dos casos se fijaron directamente en glutaraldehído al 2,5% a pH 7,2 y a 4°C, otras tomadas al momento de la autopsia fueron fijadas en formol

tamponado al 7,5% en fosfato o cacodilato de sodio. Los casos seleccionados tenían las micobacterias como principal germen oportunista; ellos fueron diagnosticados por la positividad para los bacilos ácido-alcohol resistentes evidenciada con la coloración de Ziehl-Neelsen.

El material fue procesado para su estudio ultraestructural por métodos de rutina. Todas las muestras fueron post fijadas en tetraóxido de osmio al 2%, lavadas en solución amortiguadora y deshidratadas en alcoholes a concentraciones crecientes hasta óxido de propileno. Mezclas de óxido de propileno y resinas epoxy fueron procesadas hasta la inclusión en resina pura para su ulterior polimerización en estufa a 60°C, durante 48 horas. Se hicieron cortes de una micra de espesor con cuchillas de vidrio o de diamante para examinarlos en el microscopio de luz previa tinción con azul de Toluidina. Las áreas seleccionadas fueron señaladas y llevadas como pirámides al ultramicrotomo para lograr secciones ultrafinas con cuchillas de vidrio o de diamante. Los cortes se contrastaron sobre rejillas de cobre de 300 mesh sin película de soporte con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi- 500 a 80 Kv y con aumentos directos entre 2.500 y 25.000 x.

RESULTADOS

El estudio histológico de los 30 casos de infecciones por *Mycobacte-*

rium ssp, demostró lesiones necrotizantes caracterizadas por nódulos con necrosis central con numerosos leucocitos polimorfonucleares y macrófagos; algunas de estas lesiones eran confluentes con extensas necrosis. en ocasiones las paredes vasculares estaban comprometidas. Las lesiones hepática, en el bazo y los ganglios linfáticos variaron desde nódulos focales a extensas áreas de necrosis. Con la coloración de Ziehl-Neelsen se evidenciaron bacilos ácido-alcohol resistentes en las áreas de necrosis; en ocasiones las bacterias se veían dentro de macrófagos y podían ser muy abundantes.

El estudio ultraestructural de las áreas de necrosis e inflamación inducidas por las micobacterias en los ocho casos seleccionados entre los 30 pacientes autopsiados por SIDA con evidencias histopatológicas de infección por *Mycobacterium* spp demostró siempre la presencia de las micobacterias. Las características arquitecturales de las micobacterias, fueron las de bacilos de paredes rígidas; en los cortes examinadas se vieron usualmente cortados transversalmente y en algunos cortes longitudinales llegaron a medir aproximadamente entre 3 y 4 micras de largo por 0,4 micras de diámetro (Fig. 1). Las bacterias estaban rodeadas por una membrana plasmática con su hoja interna de mayor densidad electrónica (Fig. 2). Se vieron siempre numerosos macrófagos fagocitando detritus celulares, con ovillos de membranas en sus fagolisosomas donde frecuentemente era difícil discriminar entre la es-



Fig. 1. Célula macrofágica rodeada de fibrina y con vacuolas lipídicas (L), la cual muestra su núcleo (N) y en el citoplasma una micobacteria de aspecto bacilar (flechas) rodeada por una membrana rígida y con vacuolas de grasa (estrella) en su interior.

estructura de las bacterias fagocitadas y membranas o detritus celulares (Fig. 3). En algunos casos se vieron cantidades variables de lípidos en forma de vacuolas citoplasmáticas en los macrófagos o algunas veces dentro de las bacterias (Fig. 1). Con frecuencia las micrografías electrónicas mostraron artefactos de preparación por la separación entre la pared celular de la bacteria electrón

lúcida y homogénea, del material del detritus celulares que la rodean en el citoplasma de las células macrofágicas, o de la membrana de los fagolisosomas (Fig. 3). En todos los casos, a pesar de este artificio de la preparación, se pudo observar la relación existente entre los fagosomas, los fagolisosomas de las células macrofágicas y gran número de micobacterias. Algunas de las evidencias

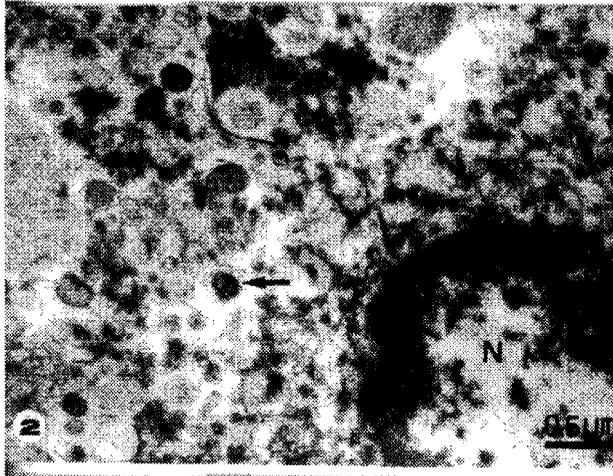


Fig. 2. Detalle de un macrófago que se encuentra en un área de necrosis rodeado por micobacterias y en cuyo citoplasma se ven numerosas vesículas y vacuolas, algunas con apariencia de figuras mielínicas (flecha), otras de mayor densidad electrónica o de aspecto multivesicular. En la parte superior del núcleo (N) se detectan algunas mitocondrias.

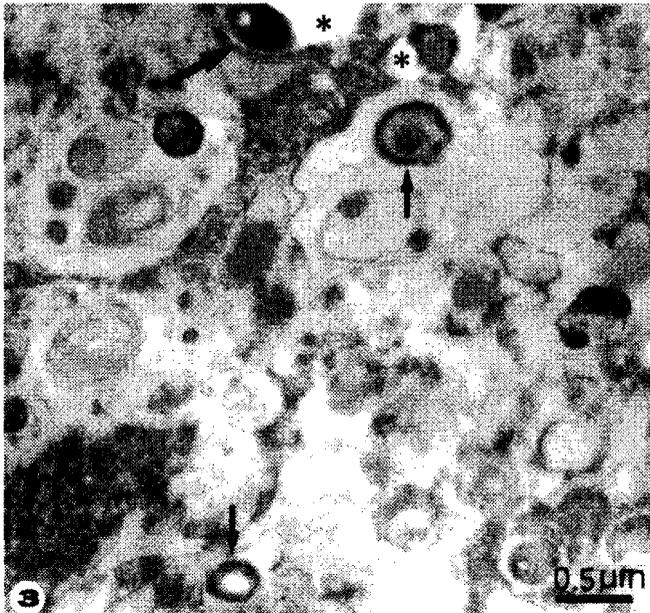


Fig. 3. Fagolisosomas de un macrófago con numerosas micobacterias (flechas), en algunas su membrana es regular con mayor densidad en su hoja interna, en otras (flecha más grande) se ven agujeros en la resina (asterisco) provocados por la pobre penetración de la misma en la pared bacteriana.

ultraestructurales descritas en este trabajo están señaladas en las microfotografías de los resultados. La correlación entre la apariencia ultraestructural de estas lesiones necrotizantes y la histopatología de diversos órganos con necrosis en los pulmones, bazo, ganglios linfáticos, hígado y riñones fue examinada y en las áreas donde se encontraban las micobacterias con macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, el aspecto ultraestructural fue similar en todos los tejidos examinados.

DISCUSIÓN

Los aspectos ultraestructurales de las alteraciones inducidas en diversos tejidos por las micobacterias han sido poco estudiados. En este trabajo, los casos examinados con el microscopio electrónico de transmisión fueron seleccionados de 30 autopsias con diagnóstico de SIDA e infección por *Mycobacterium spp*, entre un total de 230 autopsias en enfermos con SIDA. En los casos señalados, el principal germen oportunista hallado histológicamente con coloraciones para bacilos ácido-alcohol-resistentes fue *Mycobacterium spp*.

El conocimiento de la relación entre las bacterias y los macrófagos, así como de la ultraestructura de la pared celular de las micobacterias sirve para entender mejor la patogenia de las infecciones provocadas por estos microorganismos así como también el modo de acción de las drogas sobre ellas (10). Los macrófagos incorporan por fagocitosis a las

bacterias patógenas y de acuerdo a las habilidades digestivas de las células del sistema mono-cítico-macrofágico, los agentes infecciosos variarán su permanencia intracelular, determinando muchas veces el curso de las enfermedades granulomatosas: en la Leishmaniasis, en la Paracoccidioidomicosis o en enfermedades causadas por micobacterias como la lepra y la tuberculosis, se produce habitualmente una respuesta de la inmunidad humoral favorable, y la respuesta celular está caracterizada por la formación de granulomas. En los enfermos de SIDA la quimiotaxis, adherencia, actividades citolíticas y la capacidad fagocítica de las células del sistema monocítico macrofágico se encuentran disminuidas o pueden existir inmunocomplejos circulantes que modulen la respuesta inmune, por lo que usualmente los macrófagos tienen dificultades para digerir los microorganismos.

La naturaleza impermeable de las paredes de las micobacterias a varios antibióticos, y la habilidad para sobrevivir en los microambientes creados por sus hospederos, parecen ser debidas a las características fisico-químicas muy especiales de su pared celular (10); se sabe que la estructura de la pared celular de las micobacterias puede sufrir cambios fisicoquímicos durante su crecimiento y éstos pueden influir en la virulencia y en las interacciones entre ellas y las células del huésped (11). La composición química de la envoltura bacteriana en *Mycobacterium spp* se caracteriza por la pre-

sencia de ácido meso-diamino-pimélico (meso-DAP), arabinosa, galactosa y ácido N-glicolmurámico; estos ácidos mycólicos están unidos a los peptido-glicanos y representan un 25% del total de la pared celular, pudiendo en ciertas condiciones de crecimiento llegar hasta un 45% como ocurre con *Nocardia asteroides* (12). La resistencia a la permeabilidad iónica es uno de los factores que hace difícil la acción de algunos antibióticos sobre las micobacterias, los agentes lipofílicos son particularmente frenados por la bicapa lipídica, en la membrana bacteriana, las capas más superficiales presentan interacciones hidrofóbicas con glicolípidos y se producen canales fluidos llamados porines los cuales facilitan la movillización de iones hidratados en fase acuosa.

Dada la importancia de su arquitectura, la pared celular de las micobacterias, ha sido objeto de análisis fisicoquímicos y ultraestructurales detallados (6,8). Sabemos que en el material procesado rutinariamente para su estudio ultraestructural, las micobacterias precisan de una lenta impregnación en las resinas epoxy para que no se produzcan artefactos de separación entre la pared celular y el tejido circundante; una situación similar la hemos observado en la preparación de los tejidos para su estudio con el MET cuando se encuentran presentes diversos hongos. Hemos detectado también este fenómeno en casos de infección por *Mycobacterium leprae*, y estamos conscientes de que las muestras biológicas con mico-

bacterias deben ser impregnadas en las resinas epoxy de manera paulatina, por otro lado esta situación ha sido previamente descrita (6). Se ha descrito en estudios de congelación substitución, un espacio lúcido entre la membrana de *Mycobacterium kansasii*, el cual se cree provocado por los grupos fenólicos específicos que desaparecerían con los solventes lipídicos (13). Posiblemente todos estos factores influyen en la apariencia ultraestructural antes señalada.

En los casos de SIDA e infección por micobacterias, la presencia de múltiples áreas de necrosis con neutrófilos y células macrofágicas que albergan numerosas micobacterias produce una apariencia histológica amorfa y muy pocas veces granulomatosa en los focos que muestran las micobacterias; ésto contrasta con la conocida histopatología de los granulomas provocados por el *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes inmunológicamente sanos, sin embargo, este tipo de extensas lesiones necrotizantes se han descrito en los enfermos con tuberculosis asociada a la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana en Uganda (9). La ausencia de granulomas caracteriza infecciones por *Mycobacterium* spp, en los enfermos de SIDA, pero igualmente sabemos que en las autopsias de enfermos con SIDA, ésta es la manera de presentarse las lesiones por otros gérmenes oportunistas tradicionalmente granulomatosos como el *Histoplasma capsulatum* o el *Paracoccidioides brasiliensis* (1, 2, 3). Por estas razo-

nes, en nuestro laboratorio, frecuentemente en las autopsias de enfermos con SIDA. se le suman al estudio histológico de rutina coloraciones especiales, inmunohistoquímica o microscopía electrónica para investigar una correcta clasificación de los gérmenes patógenos oportunistas.

Las infecciones por micobacterias en el SIDA han sido señaladas como una causa frecuente de neumonitis (5, 6). La afectación del tejido pulmonar y de los ganglios linfáticos y el bazo fue muy notoria en nuestros casos de infecciones por *Mycobacterium sp* (1, 2, 3). Las lesiones pulmonares estaban caracterizadas por abscesos necrotizantes, muy diferentes a los granulomas inducidos por el *Mycobacterium tuberculosis*; en el centro de los nódulos necróticos, se vieron neutrófilos mezclados con macrófagos y escasos linfocitos, usualmente sin las células epitelioides características de las infecciones granulomatosas. Con frecuencia se ha destacado la dificultad para precisar la especie de micobacteria implicada en la infección (14). Algunas de las características histológicas y ultraestructurales de las lesiones inducidas en diversos órganos y tejidos por las micobacterias tienen como denominador común extensas áreas de necrosis, las cuales en algunos casos tienden a conservar una apariencia nodular, frecuentemente confluentes (1, 2, 3, 4). En ciertas ocasiones se ha descrito una apariencia fusocelular de los histiocitos cargados con micobacterias, lo que puede lle-

var al patólogo a confundir las lesiones infecciosas con un tumor mesenquimático (15, 16, 17). Hallazgos similares hemos observado en varios casos de infección pulmonar y en los tejidos blandos por *Histoplasma capsulatum* en autopsias de SIDA (García Tamayo y col. resultados en vías de publicación).

Sin lugar a dudas, existen limitaciones para precisar las cepas de micobacterias utilizando solamente las coloraciones para bacilos ácido-alcohol-resistentes (14) y la aplicación de otros métodos morfológicos incluyendo la ultraestructura no son suficientes. En nuestro medio, la microbiología en los casos de autopsias de SIDA está limitada, primero por la resistencia de los propios patólogos a autopsiar los casos de esta enfermedad y luego, por los costos operativos, los cuales en el caso particular de los cultivos para *Mycobacterium spp.* no son realizados como estudios de rutina en cualquier laboratorio de bacteriología. Recientemente técnicas de Biología Molecular, específicamente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pueden ser utilizadas para determinar con precisión las especies de micobacterias patógenas implicadas en los casos de SIDA (18, 19, 20); este tipo de estudios esperamos pueda ser aplicado en nuestros casos de SIDA e infección por *Mycobacterium spp.* y esperamos aplicarlo en el futuro cercano para dilucidar las especies de micobacterias implicadas en las lesiones que presentan los enfermos con SIDA en Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GARCÍA-TAMAYO J., MERHEB J.C.: La Patología del SIDA en Venezuela. Estudio de 40 casos. *Patología* 1988; 26:141-147.
2. GARCÍA-TAMAYO J., MERHEB J.C.: La patología del SIDA en Venezuela. Estudio de 50 autopsias. *Rev Soc Alerg Inmunol* 1989; 12:23-29.
3. GARCÍA-TAMAYO J., PÉREZ-ALMEIDA C., CALEIRAS E., DURÁN M.C.: The pulmonary pathology in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *Acta Microscop* 1993; 2:99-109.
4. ZAKOWSKI P., FLIGIEL S., BERLIN G.W., JOHNSON I.: Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* 1982; 248(22):2980-2982.
5. GREEN J.B., SIDHU G.S., LEWIN S., LEVINE J., MASUR H., SIMBERKOFF M., NICHOLAS P.: *Mycobacterium avium-intracellulare*: a cause of disseminated like-threatening infection in homosexuals and drug abusers. *Ann Int Med* 1982; 97:539-546.
6. SOHN C., SCROFF R., KIEWER K., LABEL D., FLEIGIEL S.: Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men with acquired cell-mediated immunodeficiency: a histologic and immunologic study of two cases. *Am J Clin Pathol* 1983; 79:247-252.
7. CHAISSON R.E., SCHECTER G.F., THEUR C.P., RUTHERFORD G.W., ECIFIMBERG F.F., HOPEWELL P.C.: Tuberculosis in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am Rev Resp Dis* 1987; 136:570-574.
8. SELWYN P.A., HARTEL D., LEWIS V.A.: A prospective study of risk of tuberculosis among intravenous drug users with immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989; 320:545-550.
9. NAMBUYA A., SEWANKAMBO N., MUGWERWA J., GOODGAME R., LUCAS S.: Tuberculous lymphadenitis associated with Immunodeficiency virus (VIH) in Uganda. *J Clin Pathol* 1988; 41:93-96.
10. TRIAS J., BENZ R.: Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 1994; 14:283-290.
11. AZUMA I., THOMAS D.N., ADAM A., GLUYSEN J.M., BONALY R., PETIT J.F., LEDERER E.: Occurrence of N-glycolymuramic acid in bacterial cell walls. A preliminary survey. *Biochem Biophys Acta* 1970; 208:444-451.
12. BEAMAN B.L., MORING S.E.: Relationship among cell wall composition, stage of growth and virulence of *Nocardia asteroides*. *Infect Immun* 1988; 56:557-563.

13. PAUL T.R., BEVERIDGE T.J.: Preservation of surface lipids and determination of ultrastructure of *Mycobacterium kansasii* by freeze substitution. *Infect Immun* 1994; 62: 1542-1550.
14. POLIS M.A., TUAZON C.U.: Clues to the early diagnosis of *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109:465-466.
15. BRANDWEIN M., CHO H.S., STRAUCHEN J., STOLER M.: Spindle cell reaction to non tuberculous micobacteriosis in AIDS mimicking a spindle cell neoplasm. Evidence for dual histiocytic and fibroblast-like characteristics of spindle cells. *Virchow Arch A Path Anat* 1990; 416:281-286.
16. SUSTER S., MORAN C., BLANCO M.: Mycobacterial spindle cell pseudotumor of the spleen. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:539-542.
17. WOOD C., NICOLOFF B., TODES-TAYLOR N.: Pseudotumor resultating from atypical *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection. *Am J Clin Pathol* 1985; 83:524-527.
18. PETERSON E.M., LUU R., FLOYD C.: Direct identification of *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in Bacter media using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1543-1547.
19. THIERRY D., VINCENT V., CLEMENT F., GUEDSON J.L.: Isolation of specific DNA fragments of *Mycobacterium avium* and their possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1048-1054.
20. YANG M., ROSS B., DWYER B.: Identification of an insertion-sequence like element in a subspecie of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1338-1339.