

## ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES EN LA MICROVASCULATURA DE LA REGIÓN DE LA CARA EN PACIENTES VIH

*Recibido para arbitraje: 03/11/2005*

*Aceptado para publicación: 24/03/2006*

- **Gumy C. Ibarra**, Cátedra de Histología, Odontólogo, Profesor Agregado, U.C.V.
- **Vilma Tovar**, Centro de Atención a pacientes con Enfermedades Infectocontagiosas "Dra. Elsa La Corte", Patólogo Bucal, Profesor Agregado, U.C.V.
- **Eva Nadorfy de López**, Cátedra de Bioquímica, Biólogo, Profesor Titular, U.C.V.
- **Héctor J. Finol**, Centro de Microscopía Electrónica, Biólogo, Profesor Titular, Facultad de Ciencias, U.C.V.

### Resumen

Se han descrito las alteraciones ultraestructurales en fibras musculares esqueléticas en pacientes VIH+. En fibras del músculo orbicular de los labios se efectuaron las siguientes observaciones: atrofia, desorganización del sistema sarcotubular y núcleos hipercrómicos. Los cambios encontrados en la microvasculatura, fueron compatibles con los encontrados en la fibra en enfermedades autoinmunes: Lupus Eritematoso Sistémico, Diabetes Autoinmune, Síndrome de Sjörgen. Propósito: Evaluar las alteraciones ultraestructurales en la microvasculatura asociadas a desórdenes en el músculo orbicular de los labios de pacientes VIH+. Material y Método: se tomaron biopsias del músculo orbicular de los labios de pacientes del Centro de Atención a Pacientes con Enfermedades Infectocontagiosas "Dra. Elsa La Corte" entre 2001- 2002, masculinos, femeninos, edades entre 38 y 53 años. Pacientes VIH+, bajo terapia HAART, presentando miopatía. Biopsias procesadas por técnicas rutinarias para M.E.T. Resultados: citoplasma capilar proliferativo, ruptura de la membrana plasmática de la célula endotelial, membrana basal engrosada, endotelio con áreas electrón densas y electrón transparentes, prolongaciones del citoplasma hacia la luz. Conclusión: se sugiere que los efectos del VIH sobre la microvasculatura del músculo esquelético son similares a los descritos en otras enfermedades autoinmunes.

**Palabras Claves:** microvasculatura, músculo orbicular de los labios, alteraciones ultraestructurales

### Abstract

Ultrastructural alterations of skeletal muscle fibers in HIV+ patients have been described. In orbicular muscle fibers of lips were realized the following observations: atrophy, sarcotubular system desorganization and hyperchromatic nuclei. Changes found in the microvasculature were similar to those seen in autoimmune disorders as Systemic Lupus Erythematosus, Autoimmune Diabetes and Sjörgen Syndrome. Propose: evaluation of microvascular ultrastructural alterations in orbicular muscles in HIV patients. Material and Methods: biopsies were taken from lips orbicular muscles in patients attending the Centre for the Care of Patients with Infections and Contagions diseases "Dra Elsa La Corte" between years 2001 and 2002, females and males, with ages between 38 and 53 years. Patients used HAART therapy, present myopathy. Biopsies were processed according to routine techniques for Transmission Electron Microscopy. Results: proliferative endothelial cell cytoplasm in some case rupture of plasma membrane with necrosis, widening of basement membrane, endothelial cell cytoplasm with different electron densities and infolding of cytoplasm into the lumen. Conclusion: it is suggested that the effects of HIV on the skeletal muscle microvasculature are similar to those described in other autoimmune diseases.

**Key words:** microvascular, orbicular muscle fiber, ultrastructural alterations, HIV

### Introducción

Las alteraciones ultraestructurales en la microvasculatura asociada a fibras musculares han sido descritas anteriormente en enfermedades autoinmunes como: Lupus Eritematoso Sistémico, Esclerosis Sistémica Progresiva, Artritis Reumatoidea, Síndrome de Guillain-Barré, Hipertiroidismo, así como también en el fenómeno paraneoplásico. (1,2,3,4). Entre las alteraciones encontradas en los capilares, se tienen diferencias en el grosor del endotelio con la aparición en el citoplasma de estructuras cilíndricas confrontantes, estructuras túbulo-reticulares y vacuolas autofágicas. La membrana basal se mostró en algunos casos engrosada y en otros se evidenció reduplicación. En casos muy avanzados se apreció la necrosis de la pared del

endotelio. En algunos desórdenes autoinmunes también se ha descrito la hipertrofia de las células de la pared del endotelio (5). En la mayoría de las enfermedades descritas y en el fenómeno paraneoplásico, las alteraciones mencionadas se acompañan de un infiltrado celular mononuclear y fibrosis (6,7). En cuanto a la infección por VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) se han realizado estudios ultraestructurales en biopsias neuromusculares de pacientes seropositivos en diferentes estados de infección: SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), complejo asociado a SIDA y pacientes asintomáticos. Así mismo, se ha descrito la relación entre diferentes estados de SIDA, Sarcoma de Kaposi y daños a los capilares (8). También en otros estudios de muestras de piel de pacientes seropositivos, se observó inclusiones túbulo-reticulares (TRLs) dentro del citoplasma de células endoteliales, asociándose con estados avanzados de infección por VIH (9,10) en el endomisio que es una delgada vaina de fibras reticulares y endoneuro que se corresponde con el tejido conectivo laxo que rellena los espacios entre las fibras nerviosas asociados ambos a vasos venosos (11), fue un hallazgo importante la presencia de inclusiones túbulo-reticulares (TRLs) (12) la presencia de estas estructuras, se asoció a un tiempo de vida aproximado de 12 meses después de diagnóstico de SIDA, infiriendo que los TRLs podrían ser un elemento de pronóstico para estos pacientes. Lamentablemente, existen pocos trabajos sobre la asociación SIDA- alteraciones de la microvasculatura, existiendo algunos estudios en capilares de estructuras tan diferentes como barrera hematoencefálica y corteza cerebral (13,14).

En el caso de los músculos faciales, únicamente se conoce un estudio sobre las alteraciones de las fibras en el músculo orbicular de los labios en pacientes seropositivos (15).

Por ello, como una continuación de tal trabajo, en la presente investigación, se pretende describir las posibles alteraciones microvasculares de estos pacientes.

### Material y Método

Se tomaron biopsias del músculo orbicular de los labios de pacientes que acudieron al Centro de Atención a Pacientes con Enfermedades Infecciosas "Dra. Elsa La Corte" entre 2001 y 2002, masculinos y femeninos. Edades comprendidas entre 38 y 53 años. Pacientes VIH+, bajo terapia HAART (Tratamiento antiretroviral altamente efectivo), presentando signos de miopatía: dificultad para subir escaleras, sentarse, parestesia y hormigueo en extremidades inferiores y superiores (16,17,18). A los efectos de la toma de las biopsias, se procedió a usar un bisturí en pacientes anestesiados con Lidocaina al 2% inyectada en la cara interna del labio inferior. Las muestras de tejido muscular fueron procesadas sobre una lámina de cera rosada, e inmediatamente se aplicó glutaraldehído al 2% en buffer fosfato de Millonig (320m osmolal, pH=7,4), una vez preparadas las muestras aproximadamente de 3x1mm, se continuó la fijación con la misma solución fijadora por 2 horas, para luego aplicarse tetróxido de osmio, fijador de rutina en microscopía electrónica de transmisión con el mismo buffer y bajo las mismas condiciones de osmolaridad y pH. La deshidratación se hizo en concentraciones crecientes de etanol, seguida por la inclusión en la resina EMBed-812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington). Los cortes fueron contrastados con acetato de uranio y citrato de plomo, para luego ser observados en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-500. Centro de Microscopía Electrónica Facultad de Ciencias U.C.V.

### Resultados

La microvasculatura del músculo orbicular de los labios de pacientes VIH, mostró diferentes grados de alteración que afectaron tanto al endotelio vascular como al pericito siendo esta, "una célula perivascular" (11) y a la membrana basal que envolvía a ambos. En relación a la cubierta endotelial, en algunos capilares únicamente se apreció una diferencia en el grosor y en el número de vesículas pinocíticas y caveólas, disminuyendo tal número significativamente. También se notó la presencia de prolongaciones del citoplasma endotelial hacia la luz. (Fig.1). Así mismo, se localizaron prolongaciones del citoplasma endotelial hacia la luz.

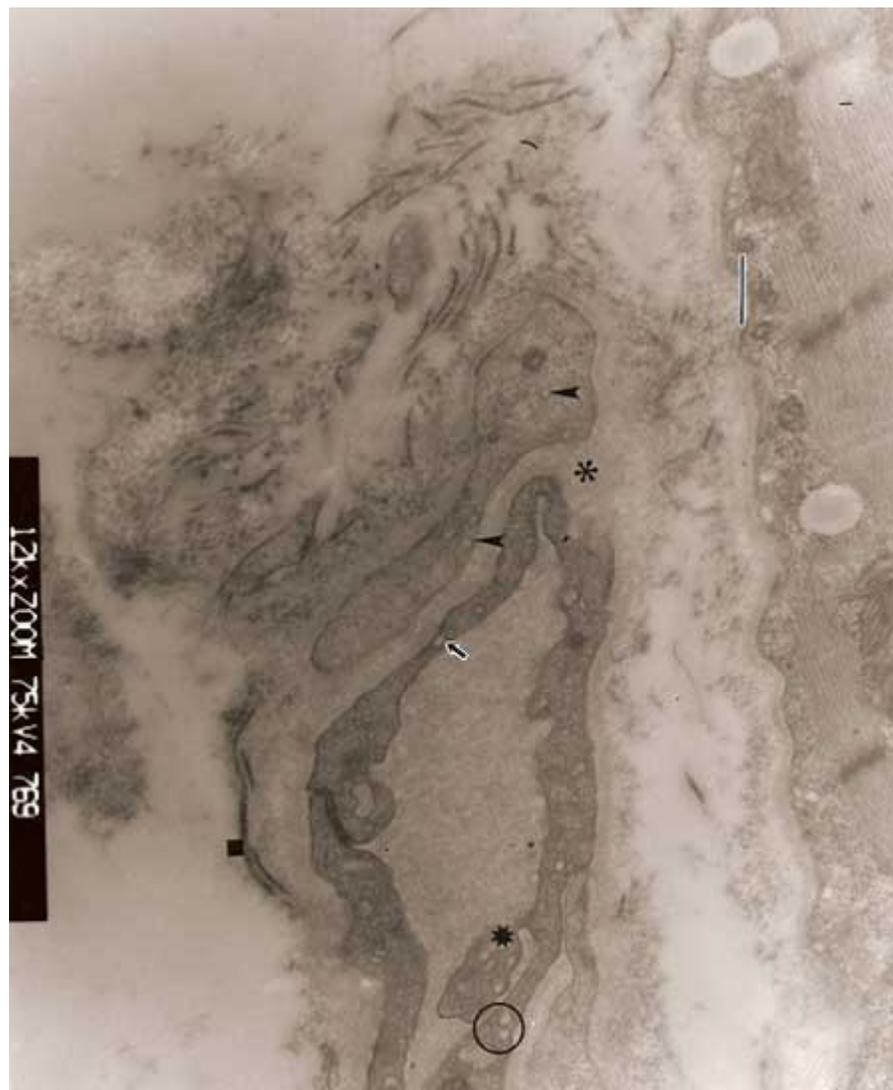


Fig. 1

En esta micrografía electrónica se aprecia una sección de capilar con diferencias en el grosor de la pared endotelial, una distribución variada de vesículas pinocíticas (o) y caveólas (↑). Nótese la presencia de una prolongación del citoplasma endotelial hacia la luz (⊗). La membrana basal (\*) está engrosada y cubierta por fibrillas de colágeno (■). Obsérvese la distribución irregular de las vesículas pinocíticas en el pericito (▲). Barra: 0,4 μm

Otros capilares exhibieron áreas del citoplasma endotelial de diferente densidad electrónica, como se observa en la fig.2. Como puede notarse en esta última parte de la pared endotelial es delgada y de gran densidad electrónica, en tanto que la otra porción está engrosada y es electrón transparente.

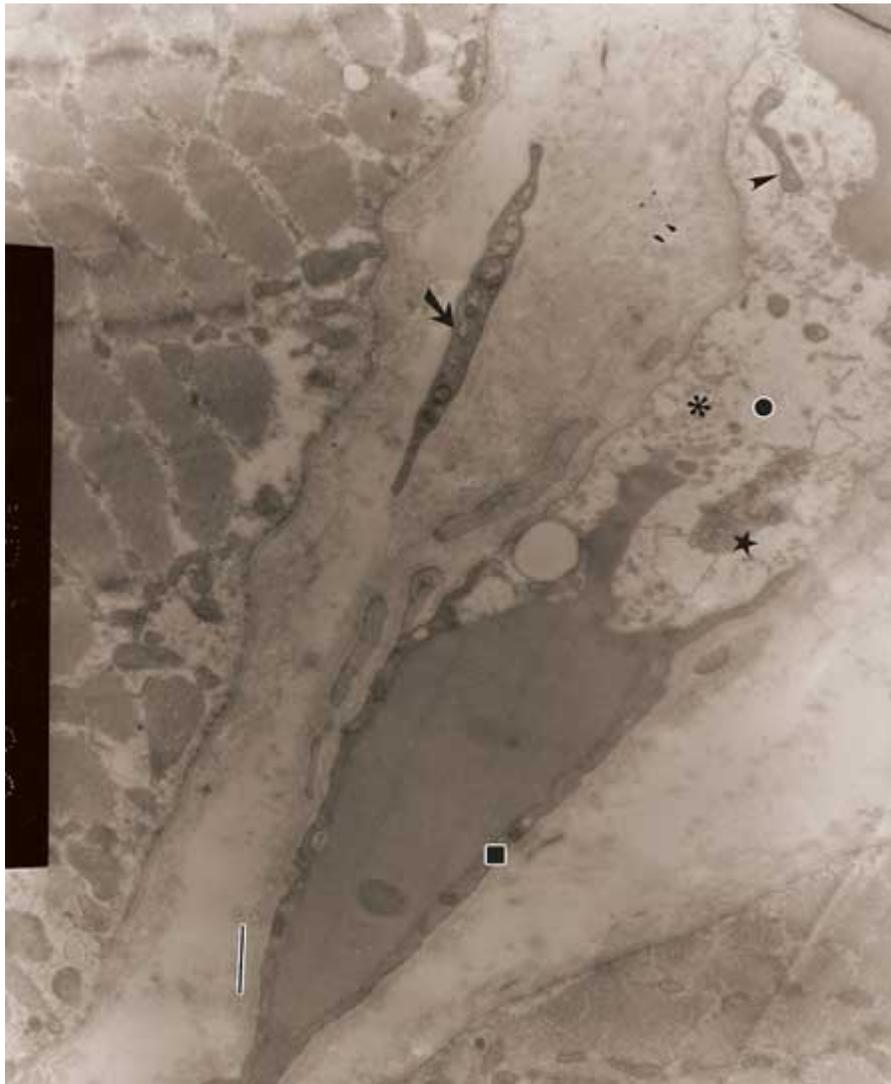


Fig. 2

En esta sección se observa un capilar endotelial con un área del citoplasma endotelial electrón transparente (●) y otra electrón densa (■). En el área electrón transparente se aprecia mitocondrias (▲), vesículas pinocíticas distribuidas irregularmente (\*) y una estructura túbulo reticular (☆). Nótese la presencia de una prolongación macrofágica (†). Barra: 0,6.µm

En esta área del citoplasma electrón transparente, aparecen algunas mitocondrias, escasas vesículas pinocíticas y cavéolas, así como unas estructuras del tipo túbulo- reticular. Otros capilares aún más alterados exhibieron la presencia de vacuolas que llegaron a producir exocitosis hacia la luz (Fig.3). definiéndose exocitosis "como el proceso por el cual se produce una fusión de la membrana celular, y el contenido se vuelca al espacio extracelular"(1) Adicionalmente, no se observaron capilares con una franca degeneración y necrosis de la célula endotelial con paso hacia la luz de restos de organelas (Fig.4).

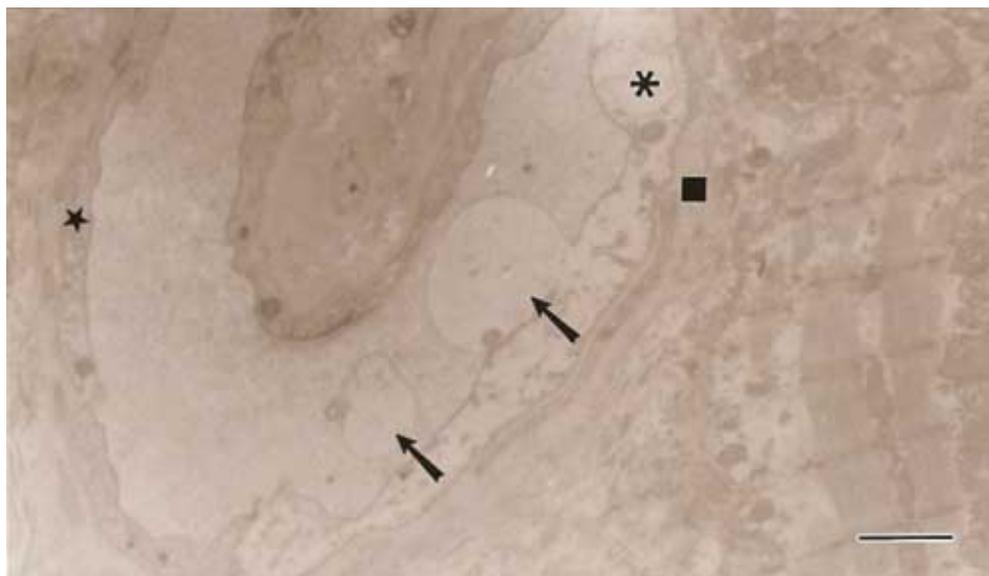


Fig. 3

En la sección se aprecia un capilar con áreas del citoplasma endotelial muy engrosadas y de baja densidad electrónica (\*) y otras mas estrechas y de mayor densidad electrónica (\*). La membrana basal se presenta engrosada (■). Nótese la formación de exocitosis a partir de la membrana endotelial (↑). Barra: 1,2μ.

Con respecto al pericito, también se notó en el mismo una disminución del contenido de cavéolas vesículas pinocíticas (Fig.1), llegándose incluso a evidenciarse un aspecto degenerativo del mismo (Fig.4).

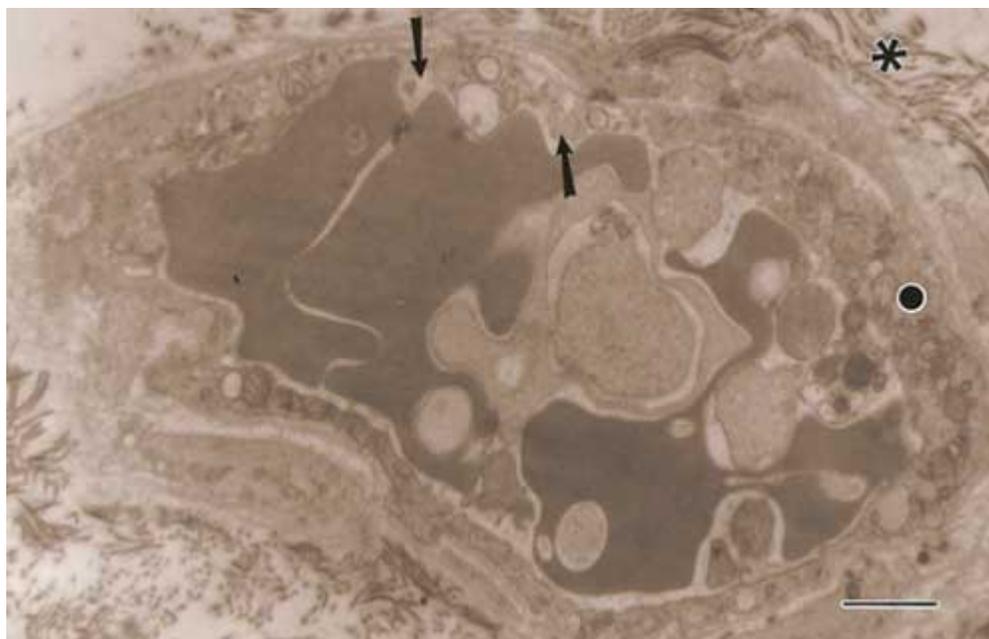


Fig. 4

En esta sección, el citoplasma endotelial se aprecia con proliferación de organelas (●) y pérdida de la membrana plasmática con salida hacia la luz de las organelas (↑). Nótese lo abundante del colágeno (\*). Barra: 1μm.

La membrana basal, que rodea tanto a la célula endotelial como el pericito se mostró engrosada en algunos capilares (Fig. 1 y 3). Asociado a tal membrana, se localizó un abundante colágeno (Fig.4).

El infiltrado celular mononuclear consistió de macrófagos (Fig. 2) y basófilos (Fig.5)

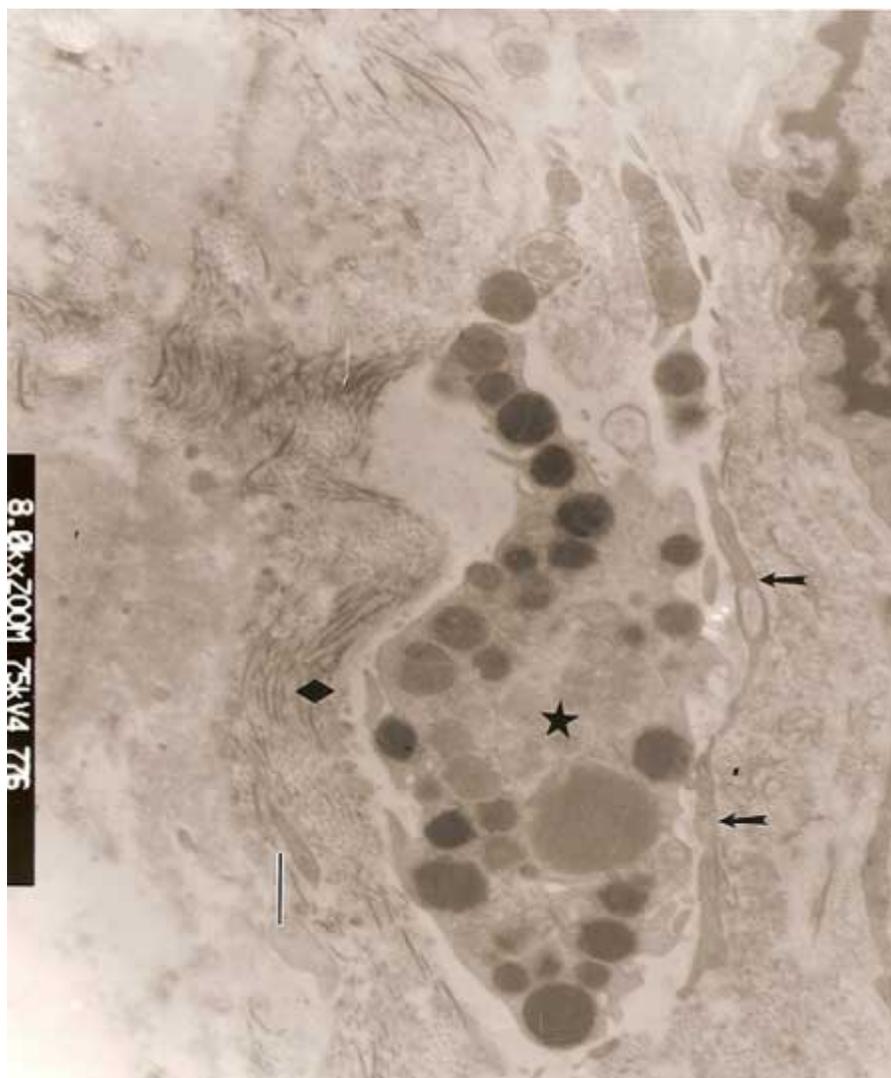


Fig. 5

Obsérvese el mastocito (★) en el espacio limitado por las prolongaciones de un macrófago (↑) y numerosas fibrillas de colágeno (◆). Barra: ,6μm

### Discusión

Las alteraciones en los capilares han sido ampliamente estudiadas en enfermedades auto inmunes. Se han reportado capilares anormales con degeneración endotelial y necrosis, desaparición de células endoteliales, proliferación de organelas, oclusión de la luz así como aumento del espesor de la membrana, reduplicación de ésta, y presencia de inclusiones microtubulares como en el Síndrome de Guillain-Barré, Miositis y la Miositis Reumatoide, (3,4,5). En trabajos realizados en pacientes con diferentes tipos de enfermedad degenerativa del colágeno, utilizando microscopía electrónica de transmisión, se encontró aumento del número de capas a nivel de la lámina basal, edema y aumento de tejido conectivo y de fibroblastos, presencia de mastocitos, así como alteraciones en la microvasculatura, pudiendo ser un determinante patogénico en enfermedades como la esclerodermia (17,18, 19, 20,21). En pacientes diabéticos y en enfermedad autoinmune de la Tiroides, se observó aumento del espesor a nivel de la membrana basal de capilares, proliferación endotelial con oclusión del lúmen y pericitos hipertróficos

(22,23). En cáncer gástrico, se observó reduplicación de la membrana indicando episodios de daño endotelial, necrosis y regeneración, presencia de mastocitos, asociándolos con los cambios presentados a nivel de membrana basal de la microvasculatura, en enfermedades autoinmunes (24,25). Los cambios morfológicos que mostraron monos infectados experimentalmente con SIV (Síndrome de Inmunodeficiencia del Simio) comparados con cambios arterioscleróticos similares inducidos experimentalmente, sugieren que la arteriopatía en SIDA, podría ser una manifestación secundaria del daño vascular, producido por la infección con el virus (26). En un estudio ultraestructural en biopsias de mucosa normal de pacientes VIH se encontraron anomalías vasculares como canales vasculares abiertos, rompimiento y desintegración de uniones intercelulares y cuerpos de Weibel Palade que desde el punto de vista estructural son vesículas alargadas limitadas por membrana y que solo se encuentran en el endotelio de las arterias (27).

Las alteraciones en la microvasculatura en muestras asociadas a músculo de la región de la cara, mostraron alteraciones muy similares, como son áreas de citoplasma endotelial engrosado con baja densidad electrónica y otras estrechas y de mayor densidad electrónica, además de la membrana basal engrosada. También se apreció proliferación de organelas y pérdida de la membrana plasmática. Estos hallazgos orientan a precisar que las alteraciones en la microvasculatura en VIH coinciden con los encontrados en diferentes tipos de enfermedades autoinmunes.

#### Referencias Bibliográficas

1. Finol H.J, Montagni S, Márquez A, Montes de Oca I and Müller B: Ultrastructural pathology of skeletal muscle in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Rheumatol.* 1990; 17:210-219.
2. Finol H J, Márquez A, Rivera H, Montes de Oca I and Müller B: Ultrastructural Systemic sclerosis inflammatory myopathy. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1994; 26(2): 245-253.
3. Finol H J, Montes de Ocas I and Márquez A: Ultrastructural of skeletal muscle in Rheumatoid Myositis. *J. Rheumatol.* 1988; 15 :552-555.
4. Finol H J, Márquez A, Montes de Oca I and Müller B: Skeletal muscle ultrastructural alterations in case of Guillain-Barre Syndrome. *Act. Cient. Venez.* 1991; 42:39-44.
5. Manneschi LI, Del Rosso A, Milia AF, Tani A, Nosi D, Pignone A, Generini S, Giacomelli R, Cerinic MM: Damage of cutaneous peripheral nervous system evolves differently according to the disease and subset of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44(5): 607-13.
6. Finol H J, Müller B, Torres S.H, Dominguez JJ, Perdomo P and Montes de Oca I: Ultrastructural abnormalities in muscular vessels of hyperthyroid patients. *Act Neuropathol* 1986; 71: 64-69.
7. Finol H J, Tonino P, Márquez A, Correa M, Müller B and Sosa L: Microvascular pathology in the skeletal muscle paraneoplastic phenomenon. *J.Submicrosc. Cytol Pathol.* 1997; 29(3): 329-334.
8. Shulze H J, Rutten A, Mahrle G, Steigleder GK: Inicial lesions of HIV-related Kaposi's sarcoma - a histological immunohistochemical, and ultrastructural study. *Arch. Dermatol. Res.* 1987; 279 (8): 499-503.
9. Kotianovsky M, Grimley PM: Ultrastructural findings in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ultrastruc Pathol.* 1985; (2-3): 123-30.
10. Pedersen C, Horn T, Junge J, Haar S, Nielsen J O: Tubuloecticular inclusions in skin biopsies from patients with HIV infection. *APMIS* 1989; 97(3): 249-252.
11. Finn Geneser *Histología Sobre Bases Moleculares Tercera Edición*, Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana, 2000, pag. 382,74.
12. Mezin P, Brion J P, Vermont J, Micoud M, Stoebner P: Ultrastructural changes associated with peripheral neuropathy in HIV/AIDS. *Ultrastruc. Pathol*, 1991; 15(6): 593-602.
13. Lossinsky AS, Shivers RR: Structural pathways for macromolecular and cellular transport cross

- the blood-brain barrier during inflammatory conditions. *Histol. Histopathol.* 2004; 19(2): 535-64.
14. Weis S, Haug H, Budka H: Vascular changes in the cerebral cortex in HIV-1 infection: I. A morphometric investigation by Light and electron microscopy. *Clin. Neuropathol.* 1996; 15 (6): 361-6.
  15. Ibarra G, Tovar V, Nadorfy López E, Del Valle S, Finol H.J., Patología ultraestructural del músculo orbicular de los labios en pacientes VIH+. *Act. Odont. Vzlna.* 2003; 41(2).
  16. Simpson D. M. and Tagliati M: Neurologic manifestations of HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 1994; 121: 769-785.
  17. Simpson D.M, Citak K.A, Godfrey E, Godhold J and Wolfe, D E, Myopathies associated with human immunodeficiency virus and zidovudine: can their effects be distinguished? *Neurology* 1993; 43: 971-976.
  18. Cuello L, Quiñones M, Finol H.J, Márquez A, Suárez R, and Gómez M, Neuromuscular Junction alterations in patients with AIDS. *Acta Microsc.* 1994; 3: 73-77.
  19. Trotta F, Biagini G, Cenacchi G, Ballardini G, Varotti C, Passarini B, Garbosa S, Faccani G, Bianchi FB, Govoni E: Microvascular changes in progressive systemic sclerosis: immunohistochemical and ultrastructural study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1984; 2(3): 209-15.
  20. Von Bierbrauer S, Barth P, Willert J, Baerwald C, Mennel HD, Schmidt JA: Electron microscopy and capillaroscopically guided nailfold biopsy in connective tissue diseases: detection of ultrastructural changes of the microcirculatory vessels.
  21. Von Bierbrauer Af, Mennel H D, Schmidt J A, Wichert P: Intravital microscopy and capillaoscopically guided nail Fol. Biopsy in scleroderma. *Ann. Rheum. Dis.* 1996; 55 (5): 305-10.
  22. Márquez A, Finol H J, De Blanco M C, Adjounian H and Pulido-Méndez: Skeletal muscle microvascular alterations in euthyroid and hypothyroid patients with autoimmune thyroid disease. *J.Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2001; 33(4): 425-432.
  23. Carlson EC, Audette JL, Veitenheimer NJ, Risan JA, Laturus DI, Epstein PN: Ultrastructural morphometry of capillary basement membrana thickness in normal and transgenic diabetic mice. *Ant. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 2003; 271(2): 332-41.
  24. Caruso RA, Ciccirello R, D´ Aquino A, Inferrera C.: Ultrastructural study of vascular response in small early gastric cancer. *Histol. Histopathol.* 1996; 11(1): 17-25.
  25. Caruso RA, Ieni A, Fabiano V, Basile G, Inferrera C: Perivascular mast cells in advanced gastric adenocarcinomas: an electron microscopic study. *Anticancer Res.* 2004; 24(4): 2257-63.
  26. Chalifoux L, Simon M, Oauley D, MacKey J, Wyand M, and Ringer D: Arteriopathy in marmosets infected with simian immunodeficiency virus. *Virus Lab Invest.* 1992; 67(3): 338-349.
  27. Zhang X, Langford A, Gelderblom H, Reichart P: Ultrastructural findings in clinically uninvolved oral mucosa of patients with HIV. *J. Oral Pathol. Med* 1989; 18(1): 35-41.