

Infectio

Asociación Colombiana de Infectología

www.elsevier.es/infectio



ORIGINAL

Glucógeno hepático en dengue severo: análisis histopatológico

Ladys Sarmiento^{a,*}, Aura Caterine Rengifo^a, Jorge Rivera^a, Marcela Neira^b,
Edgar Parra^b, Jairo Mendez^c, Gerzaín Rodríguez^d y María Leonor Caldas^a

^a Grupo de Morfología Celular, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

^b Grupo de Patología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

^c Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

^d Instituto Nacional de Salud, Colombia; Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Bogotá, Colombia

Recibido el 25 de noviembre de 2013; aceptado el 18 de diciembre de 2013

PALABRAS CLAVE

Dengue;
Dengue grave;
Glucógeno;
Hepatocito;
Diastasa

Resumen

Antecedentes: El virus del dengue afecta distintos órganos, pero se ha determinado que el hígado es el principal blanco de acción y en donde ocurre la mayor severidad del daño. Existen pocos estudios sobre los cambios histológicos durante la infección por dengue.

Objetivos: Analizar las alteraciones histopatológicas post-mortem en hígados de pacientes que presentaron la forma grave del dengue.

Métodos: Se revisaron los cortes de hígado de 20 pacientes con dengue severo y se realizaron coloraciones y pruebas para glucógeno.

Resultados: Encontramos pérdida de glucógeno citoplasmático en todos los casos analizados y la presencia de glucógeno intranuclear en dos de ellos.

Conclusiones: En este estudio se reporta por primera vez la presencia de masas de glucógeno intranuclear en hepatocitos de dos niños fallecidos con dengue grave.

© 2013 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Dengue;
Dengue hemorrhagic
fever;
Glycogen;
Hepatocyte;
Diastase

Hepatic glucogen in cases with severe dengue: histopathological changes

Abstract

Background: Dengue virus affects various organs, but the liver is the main target of damage and where the most severe damage can occur. There are few studies on the histological changes in the liver during dengue infection.

Aims: To analyze the histopathological post-mortem alterations in livers from patients with severe dengue.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lsarmiento@ins.gov.co (L. Sarmiento).

Methods: We revised serial liver sections, which were stained and tested for glycogen, from 20 patients with severe dengue.

Results: We found loss of cytoplasmic glycogen in all cases analyzed and the presence of intranuclear glycogen in two of them.

Conclusions: This is the first report of the presence of intranuclear glycogen masses during severe dengue.

© 2013 ACIN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El dengue es la enfermedad viral más importante transmitida por artrópodos en el mundo. Durante 2012 se notificaron en Colombia 53.141 casos de los cuales 1.417 correspondieron a dengue grave y 51.724 a dengue¹. En el mismo año la letalidad para dengue grave fue del 6,2%, una tasa de letalidad mayor al límite establecido por la OMS, que no debe ser superior al 2%. Esta cifra es bastante alarmante, dado que se conoce poco sobre los mecanismos de acción de la enfermedad y por ende no existen tratamientos eficaces para evitar las consecuencias fatales de la infección^{2,3}.

En este trabajo reportamos el hallazgo de glucógeno intranuclear en los hepatocitos de dos niños fallecidos por dengue grave, como resultado de tratar de identificar el origen de algunas inclusiones intranucleares metacromáticas reveladas durante el procesamiento del material para microscopía electrónica.

Estas inclusiones inicialmente se asociaron con la presencia de otro virus, pero las pruebas revelaron que se trataba de glucógeno. El procedimiento se realizaba como parte de un estudio para analizar los cambios histológicos y ultraestructurales en los diferentes tejidos de pacientes positivos para dengue grave, reportados entre 2007-2012 en Colombia.

Materiales y métodos

Selección del material

Se seleccionaron muestras de tejidos hepáticos humanos de 20 pacientes post mortem y positivos para la infección con dengue que fueron reportados entre los años 2007-2012 en Colombia. Las muestras hacen parte del archivo de Patología del INS-Colombia que se encuentran conservadas en bloques de parafina y en láminas de H&E que previamente han sido diagnosticadas para la infección mediante técnicas histopatológicas, inmunohistoquímicas y moleculares (RT-PCR)^{4,5}.

Procesamiento para Microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y microscopía electrónica (ME).

Se realizaron observaciones de las láminas de H&E para seleccionar el fragmento de tejido incluido en parafina que sería desparafinado e incluido en resina epóxica para su estudio por MOAR y ME^{4,6}.

Se hicieron cortes de 0,5 μm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina en bórax al 1%. En dos de los veinte pacientes, se demostraron inclusiones metacromáticas intranucleares sospechosas de origen viral⁷, razón por la cual se continuó el proceso para el estudio por ME de estos dos casos en particular. Con los cortes semifinos se seleccionaron las áreas para hacer cortes ultrafinos de 60 nm contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo⁴. Estos fueron observados en un microscopio electrónico Zeiss EM 109. Al tejido remanente incluido en parafina de estos dos casos se le realizó tinción con PAS (ácido peryódico de Schiff) para detección de glucógeno y con el método de PAS-diestasa para su confirmación⁵. Esta coloración se llevó a cabo porque la morfología ultraestructural indicaba la presencia probable de glucógeno⁸.

Resultados

Microscopía de luz

Con la técnica de MOAR se observó pérdida de glucógeno citoplasmático en todos los casos analizados e inclusiones intranucleares en dos de los veinte casos analizados. Dado que el informe histopatológico no reportaba estas inclusiones se pensó que las mismas correspondían a la presencia de un virus diferente al dengue y que solo podía evidenciarse luego de someter el tejido a MOAR. A continuación se reexaminaron las tinciones de H&E y se observó que algunos núcleos tenían apariencia vacía o hueca aún notoria cuando uno de los casos presentaba alto grado de autólisis (fig. 1a). Los núcleos vacíos se correspondían con las áreas que evidenciaban glucógeno intranuclear con la coloración de PAS realizada después de la observación del material por ME que se pretendía identificar (fig. 1b).

La coloración de PAS produjo una tinción fuerte de color violeta o rojo con distintas tonalidades en los núcleos con las inclusiones. Esta reacción se eliminó al someter el tejido a digestión con diestasa, lo cual confirmó la presencia de glucógeno. La tinción de PAS se distribuyó en los núcleos ubicados hacia la periferia del lobulillo hepático, delimitando perfectamente el hexágono que lo conforma. Esta tinción se encontró con un porcentaje del 40% y el 62% de los núcleos para cada uno de los dos casos en donde además se observó fragmentación del glucógeno intranuclear en un porcentaje máximo del 16% (fig. 1b).

En el análisis de MOAR la toluidina reveló algunos núcleos irregulares, que contenían material metacromático, rodeado de un espacio claro y desplazado hacia la

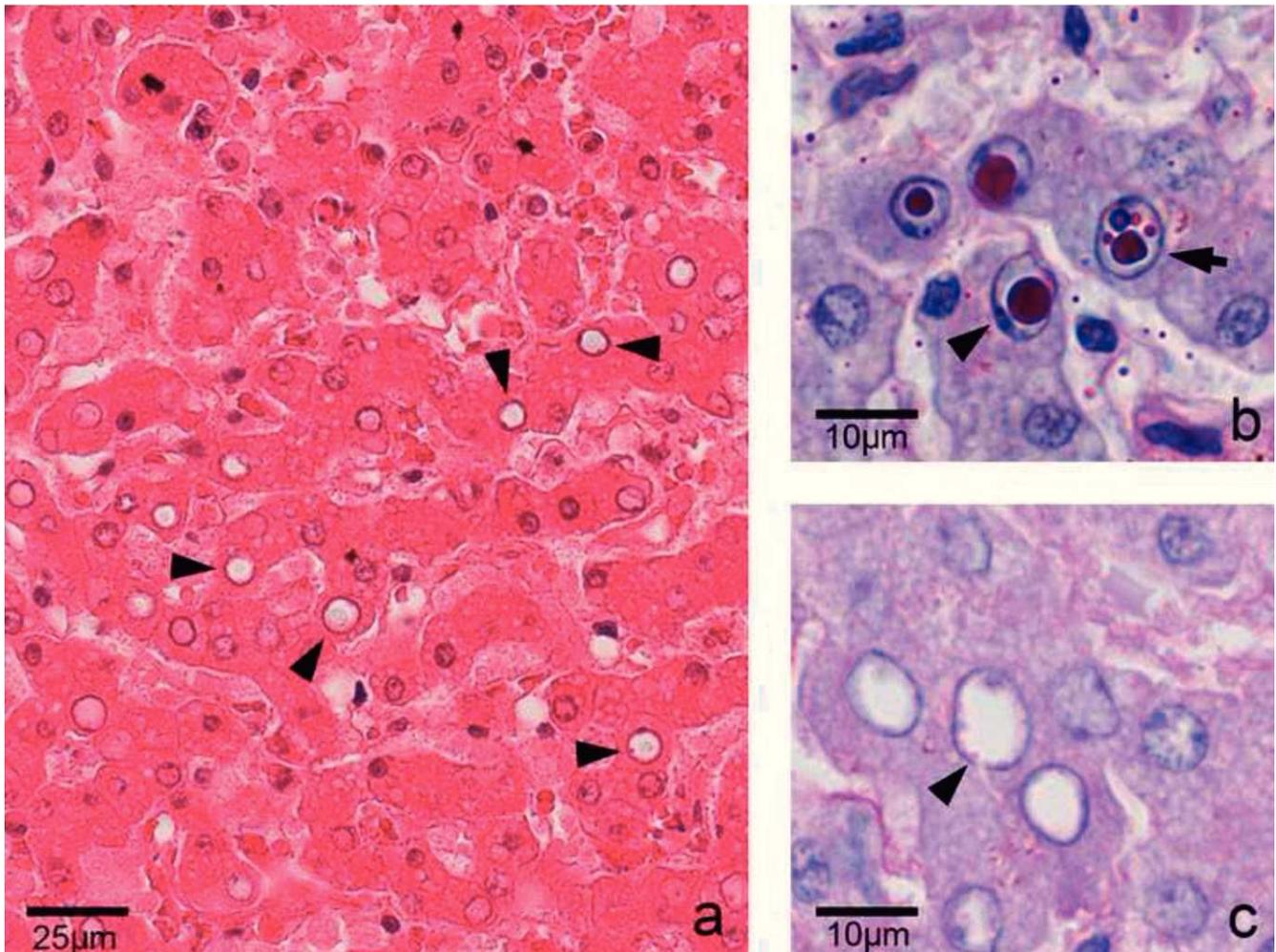


Figura 1 Inclusiones intranucleares en hepatocitos localizados a la periferia del lobulillo. a) Coloración de H&E, se aprecian núcleos vacíos con cromatina periférica. b) Coloración de PAS. Se observan inclusiones PAS positivas en núcleos de hepatocitos (punta de flecha), algunas de ellas están fragmentadas (flecha). c) Coloración PAS diastasa, se observa que las inclusiones desaparecen cuando se someten a digestión con diastasa.

periferia, se observó una delgada franja de cromatina, en contacto con la membrana nuclear (fig. 2b). Algunas veces el nucléolo también se notó desplazado hacia la periferia del núcleo. El material que se observaba particulado en dos o tres fragmentos medía entre 1,33 μm y 2,06 μm . Los núcleos afectados medían en promedio de 7,07 μm y los no afectados 5,33 μm .

Microscopia electrónica

Ultraestructuralmente se observaron algunos hepatocitos con núcleos irregulares que en el centro contenían una estructura irregular sin membrana que la rodeara y con un tamaño promedio de 750 nm. La estructura estaba conformada por partículas de 20 a 30 nm que podían corresponder a glucógeno en configuración beta⁸ (fig. 2). Al igual que en la observación de MOAR, aquí se logró apreciar un espacio claro que circundaba la estructura y a continuación desplazada hacia la periferia del núcleo, se observaba la cromatina rodeada por la membrana nuclear. En algunos hepatocitos se notó el desplazamiento del nucléolo hacia la periferia del núcleo.

El citoplasma del hepatocito contenía las estructuras usuales, que no eran fáciles de identificar dadas las con-

diciones de fijación del tejido no recomendadas para microscopia electrónica (ME). No se observaron agregados de partículas correspondientes a glucógeno en rosetas o en configuración alfa, forma característicamente encontrada en el citoplasma de dichas células. Algunos hepatocitos estaban vacuolados y con artificios, producto del reprocesamiento de un material que originalmente estaba incluido en parafina y que fue re-incluido en resina para poder ser observado al ME. No se observaron partículas que sugirieran corresponder a un virus.

Discusión

En 1883 Ehrlich describió vacuolas de glucógeno en el hígado de pacientes con diabetes mellitus y posteriormente se demostró que estaban localizadas en el núcleo⁹.

Además de los reportes en diabetes^{10,11} estas inclusiones se han descrito ocasionalmente en pacientes con enfermedad de Von Gierke¹², lupus eritematoso¹³, hepatitis aguda y crónica^{14,15}, arterioesclerosis, neoplasias e inflamación aguda supurativa⁹, síndrome de Dubin Johnson¹⁶ y enfermedad de Wilson¹⁷.

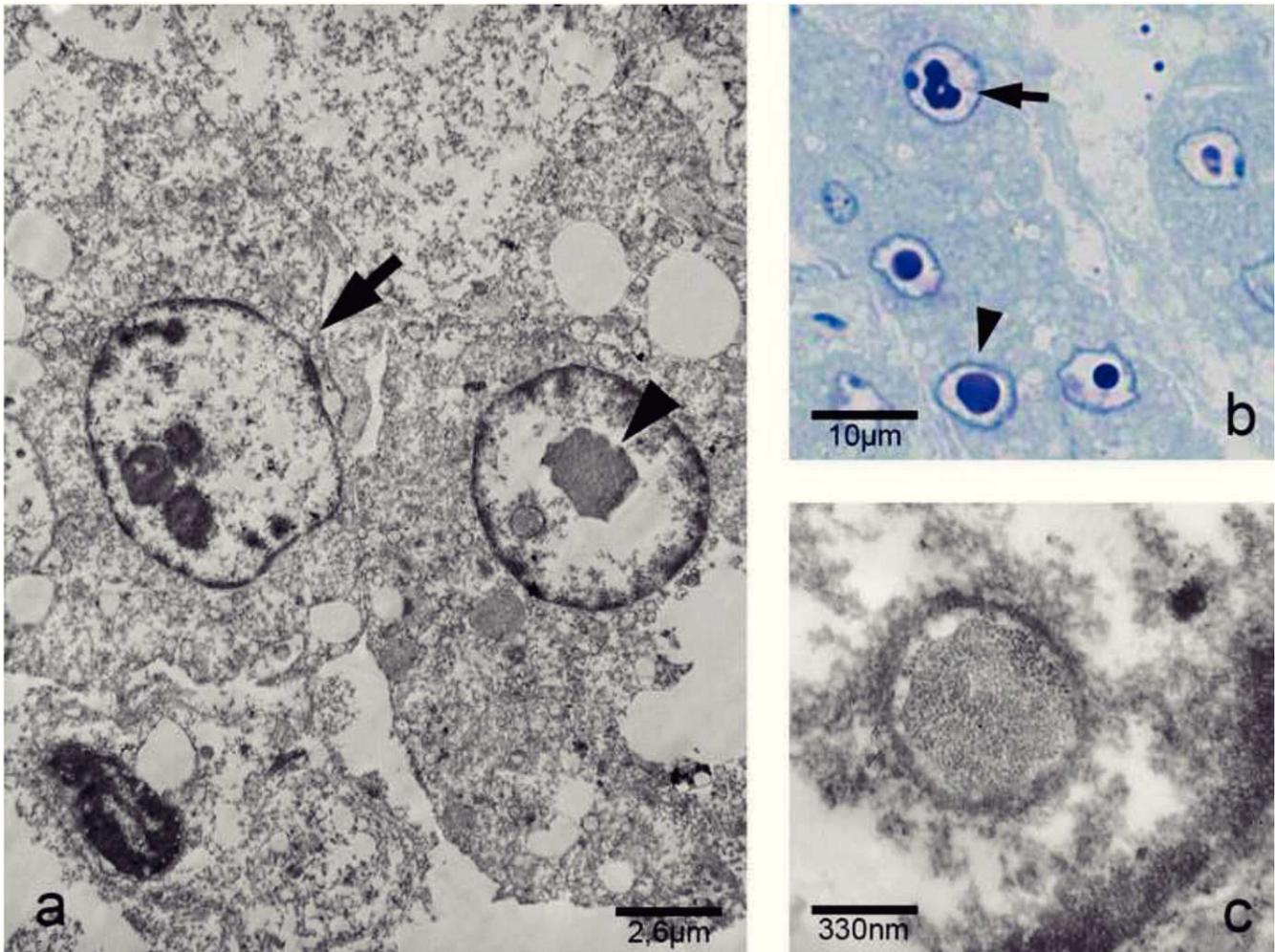


Figura 2 Microscopia electrónica y MOAR de inclusiones intranucleares. a) Núcleo normal de hepatocito (flecha) y núcleo con inclusiones (punta de flecha). b) Coloración de azul de toluidina. Se ven inclusiones intranucleares (punta de flecha), una de ellas fragmentada (flecha). c) Ampliación de la inclusión intranuclear de a, en la que se observa material particulado.

La presencia ocasional de glucógeno intranuclear también se ha reportado en autopsias de personas aparentemente saludables¹⁸, además en algunos animales incluyendo vacunos y caprinos^{19,20}. La diferencia entre la presencia normal o anormal de glucógeno intranuclear estaría dada por la cantidad presente en el tejido. Se han reportado incidencias del 0,4% en un caso de diabetes mellitus y hasta a 50-60% en hepatitis crónica^{15,21}. En nuestro estudio los dos casos encontrados presentaron una incidencia de glucógeno intranuclear del 40 y 62% semejante a la reportada en hepatitis crónica y mucho mayor a la descrita en ausencia de enfermedad que corresponde a menos del 0,1%⁹.

Hasta el momento el hallazgo del glucógeno intranuclear no se puede relacionar como un cambio atribuible a la patología del dengue debido a que tan solo apareció en dos casos de veinte. Es importante anotar también que, en la historia clínica disponible de uno de los dos casos, el único antecedente patológico previo era una virosis con posible dengue clásico un año atrás y "rash" el mes anterior.

Es necesario aumentar el número de casos para el estudio, especialmente de niños, porque dos de los seis casos de los niños incluidos en el estudio presentaron glucógeno intranuclear en los hepatocitos. Las variaciones observa-

das en la intensidad del PAS se atribuyen a variaciones en la cantidad de glucógeno. Estas van de púrpura oscuro al rojo oscuro y rojo brillante indicando el mayor o menor nivel de glucógeno²². Se ha descrito una secuencia para la liberación del glucógeno de forma que este desaparece primero de las células centrales del lobulillo hepático⁹.

Nosotros observamos glucógeno exclusivamente hacia la periferia; es posible suponer que el evento haya sido captado en una etapa avanzada de dicha liberación cuando ya se ha consumido el de las células centrales del lobulillo.

Los fragmentos de glucógeno intranuclear presentaron un área de 1,33 μm y 2,06 μm . Esto se ha descrito en experimentos de inanición en donde se efectúa primero el consumo de glucógeno intracitoplasmático y finalmente el nuclear previo a la fragmentación²².

Algunos eventos relacionados con la disfunción hepática del dengue podrían ser responsables de la pérdida del glucógeno, por ejemplo, los niveles elevados en las transaminasas. Las alteraciones de estas enzimas pueden modificar el catabolismo de aminoácidos glicogénicos y por ende alterar la biosíntesis del polisacárido²³.

La imposibilidad de observar a la ultraestructura las características rosetas alfa, propias del citoplasma de los

hepatocitos, puede ser otro indicio de que el proceso se captó en una etapa avanzada del consumo de glucógeno en donde ya se ha consumido el intracitoplasmático. Sin embargo hay que anotar que el proceso de fragmentación que se describe, previo al inicio del consumo de glucógeno intranuclear, fue observado en nuestros casos en un porcentaje máximo del 16% que no parece ser tan alto como para indicar una etapa avanzada de consumo de glucógeno.

En este estudio se reporta por primera vez la presencia de masas de glucógeno intranuclear en hepatocitos de dos niños fallecidos con dengue grave, un hallazgo que se ha encontrado en otras patologías así como en personas y animales sanos aunque a incidencias mucho menores de las encontradas cuando se asocia a una enfermedad.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo no permiten afirmar que las inclusiones estén directamente relacionadas con la patología del dengue, pero estos hallazgos deben aumentar el interés sobre el estudio del tejido hepático de pacientes positivos para dengue que presenten núcleos de apariencia hueca en el diagnóstico histopatológico convencional.

Las inclusiones de glucógeno son llamativas, grandes y no deben confundirse con inclusiones virales. Pruebas sencillas con diastasa y la coloración de PAS esclarecen su origen y la mayor incidencia de las mismas podrían ser un nuevo marcador que amplíe el conocimiento sobre los cambios histopatológicos y bioquímicos que ocurren durante la infección por virus dengue.

Financiación

El trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. SIVIGILA Boletín epidemiológico semanal, Subdirección de vigilancia y control en salud pública, Instituto Nacional de Salud semana epidemiológica 51. 2012.
2. World Health Organization. Dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, treatment and control. 2007 [consultado 23 Ene 2012]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>
3. Whitehorn B, Smmons C. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*. 2011;29:7221-8.
4. García del Moral R. Métodos y técnicas de inclusión. En: Laboratorio de Anatomía Patológica. México: Mc Graw Hill Interamericana de España, 1986. p. 66-88.
5. Domingo C, Palacios G, Niedrig M, Cabrerizo M, Jabado O, Reyes N, et al. A new tool for the diagnosis and molecular surveillance of dengue infections in clinical samples. *Dengue Bulletin*. 2004;28:87-95. New Delhi: WHO Regional Office for South-East Asia [consultado 1 Oct 2013]. Disponible en: [http:// repository.searo.who.int/handle/ 123456789/ 1598](http://repository.searo.who.int/handle/123456789/1598)
6. Caldas M, Ricaurte O, Rodríguez G, Amaya J. Microscopía óptica de alta resolución MOAR. Bogotá: Instituto Nacional de Salud de Colombia; 1993.
7. Dalton A Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages. Nueva York: Academic Press INC; 1973.
8. Fawcett Don W. La célula. En: Tratado de histología. Mexico: McGraw-Hill; 1991. p. 1-22.
9. Chipps H, Duff D. Glycogen infiltration of the liver cell nuclei. *Am J Pathol*. 1942;18:345-59.
10. Torbenson M, Chen Y, Brunt E, Cummings O, Gottfried M, Jakate S, et al. Glycogenic hepatopathy: an underrecognized hepatic complication of diabetes mellitus. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:508-13.
11. Eridell J, Saxena R, Chalasani N, Goggins W, Powelson J, Cummings O. Complete reversal of glycogen hepatopathy with pancreas transplantation: two cases. *Transplantation*. 2007;83:84-5.
12. Sheldon H, Silverberg M, Kerner I. On the differing appearance of intranuclear and cytoplasmic glycogen in liver cells in glycogen storage disease. *J Cell Biol*. 1962;13:468-73.
13. Sparrow T, Ashworth C. T electron microscopy of nuclear glycogenosis. *Arch Pathol*. 1965 80:84-90.
14. Gmelin K, Kommerell B, Waldherr R, Ehrlich V. Intranuclear virus like particles in a case of sporadic non A, non B hepatitis. *J Med Virol*. 1980;5:317-22.
15. Mori M, Dempo K, Abe M, Onoc T. Electron microscopy study of intranuclear glycogen. *J Electron Microscopy*. 1970;19:163-9.
16. Hayashi H, Masuko K, Yamada K, Oguri T. Dubin Johnson syndrome. With glycogen nuclei of the liver. *J Gastroenterol*. 1972;7:231-9.
17. Anderson P, Popper H. Changes in hepatic structure in Wilson disease. *Am J Pathol* 1960;36:483-97.
18. Geller S, Petrovic L. Biopsy interpretation of the liver. 2.ª ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2009. p. 30-1.
19. Reid M. Hepatic nuclear glycogenosis in the cow: A light and electron microscope study. *J Pathol*. 1973;110:267-70.
20. Fenwick B, Muir S, East N. Hepatic and renal tubular cell nuclear glycogenosis in goats. *J Comparative Pathol*. 1986;96:399-405.
21. Bogoch A, Casselman W, Kaplan A, Bockus H. Studies of hepatic function in diabetes mellitus, portal cirrhosis and other liver disease. A correlation of clinical, biochemical and liver needle biopsy findings. *Am J Med*. 1955;18:354-84.
22. Himes M, Pollister A. Symposium: Synthetic processes in the cell nucleus v glycogen accumulation in the nucleus. *J Histochem Cytochem*. 1961;10:175-85.
23. Lehninger A. Biosíntesis de los glucídicos. En: Bioquímica Leninger. Barcelona: Omega; 1981. p. 635-42.