

## **Hallazgo de inclusiones intranucleares en parótida, páncreas y médula, en un caso de esclerosis lateral amiotrófica. Reporte preliminar**

S. MESA CASTILLO Y O. ANCHETA NIEBLA

*Inst. de Neurología y Neurocirugía y Dpto. de Microscopia Electrónica,  
Centro Nacional de Investigaciones Científicas,  
Ciudad de la Habana, Cuba*

*Recibido: 6 de octubre de 1977*

*Recibido: 30 de marzo de 1978*

**ABSTRACT.** An electron microscopic study is made of cervical marrow, parotid gland and pancreas from a patient who died the sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. The presence of intranuclear inclusions in the glial cells, fundamentally in astrocytes, and in the glandular cells of the parotid gland and pancreas is observed. These findings, together with other works in the literature, with which they are related, are discussed.

**RESUMEN.** Se hace un estudio con el microscopio electrónico de médula cervical, parótida y páncreas de un paciente fallecido por la forma esporádica de esclerosis lateral amiotrófica. Se observa la presencia de inclusiones intranucleares en las células gliales, fundamentalmente en astrocitos, en las células glandulares de la parótida y del páncreas. Se discuten estos hallazgos con otros trabajos de la literatura con los que se relaciona.

### **INTRODUCCION**

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad del sistema nervioso cuya etiología se desconoce. Numerosos investigadores han dedicado sus esfuerzos a tratar de dilucidar la verdadera naturaleza de la enfermedad, sin que hasta la fecha este problema haya sido aclarado satisfactoriamente.

En nuestro trabajo, inspirados en el esfuerzo de algunos de estos investigadores y la posible etiología viral planteada, dada la observación per-

sonal de pacientes de ELA que habían padecido parotiditis en la adultez, decidimos realizar investigaciones encaminadas a tratar de correlacionar este dato con el posible hallazgo de partículas virales en médula, parótida y páncreas, teniendo en cuenta la disfunción conocida descrita para estas dos últimas glándulas en la ELA.

## MATERIAL Y METODO

Se obtuvo material de necropsia de un paciente de la forma esporádica de ELA, fallecido en el Instituto de Neurología y Neurocirugía de la Ciudad de la Habana. Parte de este material fue procesado y estudiado posteriormente en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

La autopsia fue realizada dentro de la primera hora después de fallecido el paciente. Se obtuvo material de necropsia de médula cervical, parótida y páncreas para estudio de microscopia óptica y electrónica. El material para microscopia óptica fue procesado según técnica habitual. El material de microscopia electrónica fue fijado en glutaraldehído al 3,2% en tampón cacodilato a 4 °C. Se postificó en 0,04 al 2% en el mismo tampón. Posteriormente se deshidrató en alcoholes a concentraciones crecientes. Se infiltró e incluyó en Epon 812 (*Luft, 1961*). Se hicieron cortes ultrafinos en un ultramicrotomo Ultratome III LKB. Se hizo el poscontraste con acetado de uranilo y citrato de plomo (*Reynolds, 1963*). Los cortes fueron examinados en un microscopio Tesla Mod. BS-500.

## RESULTADOS

Del estudio necrópsico realizado al microscopio óptico fueron visualizadas inclusiones intracelulares del tipo descrito por Bunina e Hirano (*Hirano y cols., 1969*) con aumento de la densidad, de forma redondeada y rodeadas por un halo claro. Dichas inclusiones aparecieron en número de cinco a seis por célula y fueron vistas solamente en las neuronas mesocefálicas de la sustancia nigra. El resto del material de autopsia no mostró ningún tipo de inclusión.

*Microscopia electrónica.* El material procedente de la médula cervical mostró inclusiones intranucleares en las células gliales, con mucha ma-

por frecuencia en los astrocitos fibrilares. Dichas inclusiones tenían formas redondeadas, con una zona central de mayor densidad electrónica y estaban rodeadas por una zona más clara constituida por capas concéntricas que rodeaban a la zona oscura central. El tamaño de las inclusiones fue de 200 a 220 nm. El diámetro de la zona central fue de 80-100 nm y la medida de la zona externa de 90 nm (Fig. 1). En ocasiones se observaron dos y tres inclusiones en una misma célula (Fig. 2).

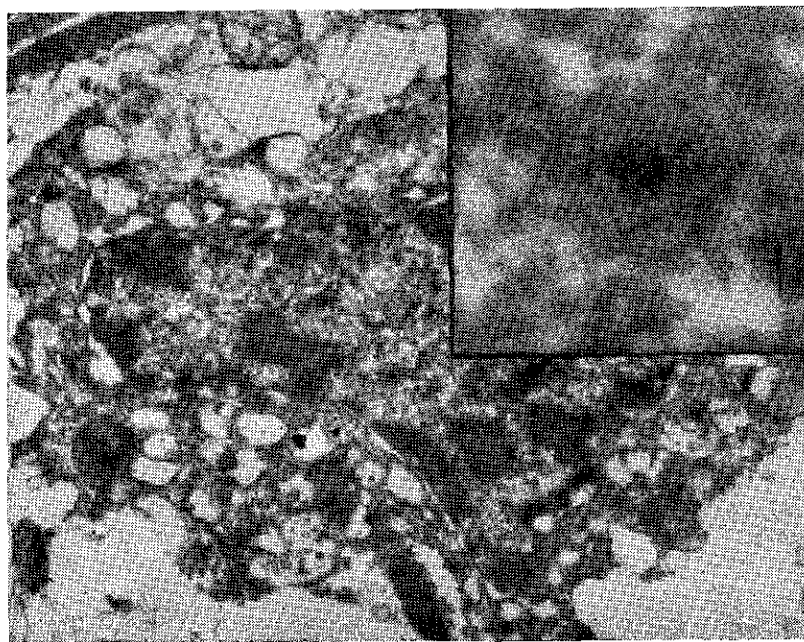


Fig. 1. Inclusión esférica intranuclear con zona central de mayor densidad electrónica (16 250 x). Astrocito fibrilar. Médula cervical. INSET (70,040 x).

El material procedente de la parótida reveló inclusiones similares a las observadas en la médula, en un número mayor (Fig. 3). También pudieron observarse en parejas y en otras ocasiones en número de tres inclusiones. A veces se observó una distribución en cadena, como si fueran tres fases de una estructura similar en proceso de formación.

El material procedente del páncreas reveló inclusiones intranucleares similares, pero escasas y en menor proporción que en la médula. Sus características ultraestructurales fueron semejantes a las descritas anteriormente (Fig. 4).

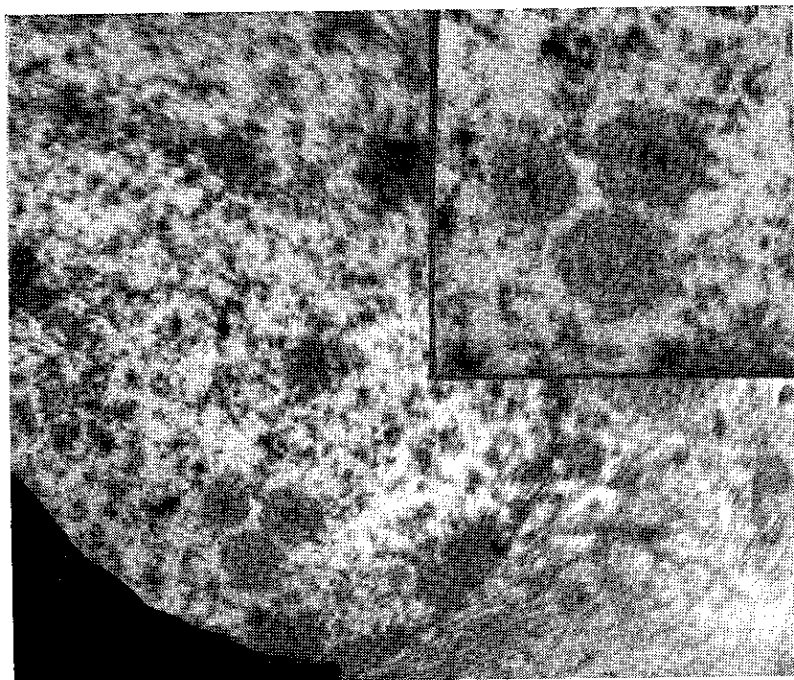


Fig. 2. Tres inclusiones en un astrocito fibrilar (14 000 x). INSET (18,204 x).

## DISCUSION

El paciente fallecido estudiado por nosotros con casi tres años de evolución de la enfermedad lentamente progresiva y cuyo diagnóstico fue fácilmente hecho de corresponder a una forma esporádica de ELA, padeció de parotiditis siete años antes de comenzar los síntomas de la enfermedad del sistema motor. Ello motivó, junto a la observación de otros pacientes de ELA que también habían padecido la parotiditis des-

pués de la edad adulta, que estudiáramos la ultraestructura de esta glándula y la del páncreas, glándula con la cual se relaciona anatómica y fisiopatológicamente, tal es el caso bien conocido de la parotiditis y pancreatitis que se observa en el curso de la infección por el mixovirus de las paperas.

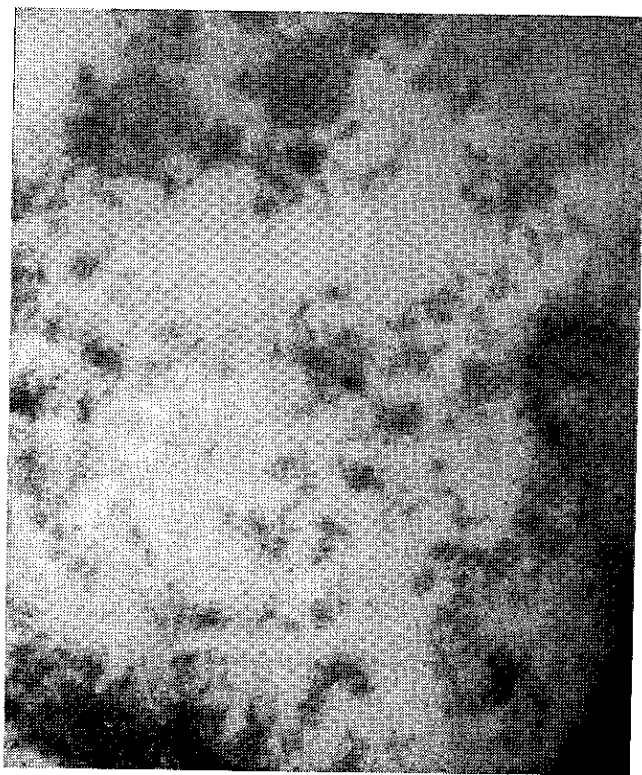


Fig. 3. Dos inclusiones intranucleares en parótida con iguales características a las observadas en la médula (21,600 x).

Ha sido señalada en la literatura la observación por algunos investigadores de la hipofunción pancreática o la hipofunción pancreática y parotídea o la observación de aparición de ELA en pacientes gastrectomiza-

dos (*Ask Upmark, 1950; Charchaflye et al., 1974; Quick, 1969*). En estos trabajos se trató de correlacionar dichos hallazgos con la etiología de la enfermedad. Por otra parte, son conocidos los trabajos de investigadores soviéticos *Zil'ber et al., 1963*), los que lograron realizar la transmisión experimental de la enfermedad al chimpancé, y plantearon la etiología viral.

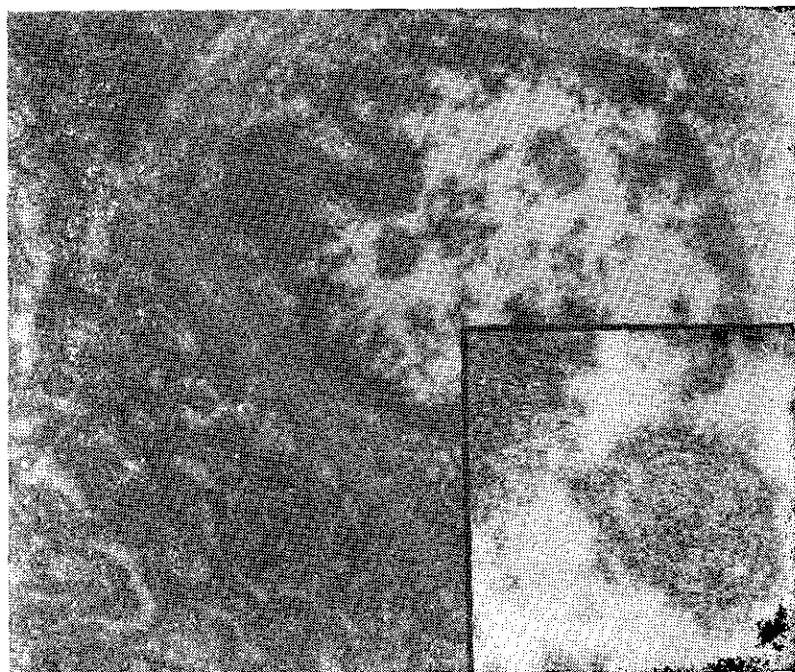


Fig. 4. Inclusión intranuclear en páncreas. (11,960 x). INSET (56,320 x).

Otros esfuerzos se realizaron recientemente por otros investigadores (*Norris et al., 1975; Oshiro et al., 1976*) con el objeto de visualizar partículas virales. En uno de estos trabajos (*Norris et al., 1975*) se presenta un paciente portador de ELA después de sufrir varios episodios de una meningoencefalitis linfocítica recurrente, en el cual se observan partículas celulares de forma tubular. Estos resultados, a nuestro entender,

tienen como objeción el antecedente de una enfermedad previa y que se repite en episodios sucesivos posiblemente en relación con una etiología viral y, por lo tanto, la presencia de partículas puede más bien estar en relación con la enfermedad anterior y no con la ELA.

El otro trabajo publicado revela inclusiones semejantes a virus en el músculo (*Oshiro et al.*, 1976), pero no se pudieron encontrar inclusiones en el sistema nervioso, a pesar de realizarse estudios en este sentido. En nuestro caso, la única enfermedad viral que precedió a la ELA fue la parotiditis y en un lapso de tiempo lo suficientemente prolongado para que no nos permita correlacionar las inclusiones encontradas como dependientes de una enfermedad viral aguda de curso breve. No obstante, nos planteamos hasta qué punto el virus de las paperas puede ser relacionado o no con la esclerosis lateral amiotrófica, por tratarse esta última de una enfermedad crónica, muy parecida en su curso y características generales a las enfermedades descritas para los "virus lentos" y en las que los mixovirus parecen desempeñar un papel importante. En la panencefalitis esclerosante subaguda un mixovirus se demostró ser el agente causal (*Zeman et al.*, 1968.) Distemper es otro ejemplo bien conocido. En otras patologías de este tipo, la naturaleza viral sino demostrada completamente para virus convencionales, es un hecho en el Jakob-Creutzfeldt, kuru, scrapie y otras, dado el carácter de su transmisibilidad ajustada al criterio de enfermedad transmitida por virus (*Gilbbs et al.*, 1968; *Gajdusek et al.*, 1965; *Gajdusek et al.*, 1967).

En los trabajos de Grunnet, (1975) se pudieron observar inclusiones intranucleares similares a las nuestras, descritas antes por Bouteille y cols, en otros trabajos (1967). Asimismo se hace referencia a la etiología viral de la enfermedad de Jakob-Creutzfeldt (cuya transmisibilidad ha sido lograda) y a la enfermedad de Alzheimer, basado en una serie de trabajos anteriores en que dichas inclusiones se han observado en patologías virales (*Patrizi et al.*, 1969; *Zurhein et al.*, 1968). Sin embargo, se plantea también la posibilidad de que las inclusiones puedan estar en relación con un proceso de proliferación celular no específico, descrito por otros autores.

En nuestro caso, si bien esto último pudiera ser planteado para la médula, donde siempre existe una ligera a moderada proliferación astrocítica y haber sido observadas precisamente dichas inclusiones prefe-

rentemente en los astrocitos, no tendría igual explicación para la parótida y el páncreas donde no han sido descritas alteraciones estructurales hasta la fecha. Por otra parte, en las parótidas pudimos observar proporcionalmente mayor número de estas inclusiones en sus células epiteliales sin que existiera evidencia de proliferación celular. Este último dato lo hemos confirmado en un segundo caso estudiado por nosotros (no publicado) donde además de encontrar las inclusiones citadas en las estructuras referidas, han sido visualizadas en testículo.

Nuestro trabajo estaría más acorde con los resultados de Patrizi et al., (1969), en cuyos trabajos experimentales con el mixovirus de la vacuna se observan mayor número de estas inclusiones en aquellas áreas de tejidos menos sometidas a la proliferación. Por otra parte, es bien conocido que los virus de por sí pueden inducir la proliferación celular (Menkes et al., 1969), lo cual plantea un doble problema de interpretación. También pueden aparecer virus en enfermedades asociadas a otras crónicas debilitantes (Kepes et al., 1975; Sponzilli et al., 1975) como la leucoencefalopatía multifocal progresiva sin que los virus sean la causa de la enfermedad debilitante que favoreció su aparición: esprue, tuberculosis, neoplasias.

A pesar de que las inclusiones observadas en nuestro trabajo no se pueden relacionar directamente con una enfermedad de etiología viral demostrada, su presencia se ha visto frecuentemente relacionada con enfermedades virales conocidas, o en las que se sospecha esta etiología. La observación de estas inclusiones en la parótida y el páncreas plantea nuevos problemas de interpretación de su posible rol en la fisiopatología de la enfermedad. También es necesario tratar de visualizar partículas virales y realizar pruebas biológicas para aislamiento e identificación de virus a partir de estos órganos.

## REFERENCIAS

- ASK-UPMARK E. Amyotrophic lateral sclerosis observed in five persons after gastric resection. *Gastroenterology* 15, 257, 1950.
- BOUTEILLE M., KALIFAT S.R. AND DELAURE J. Ultrastructural variations of nuclear bodies in human disease. *Journal of Ultrastructural Research* 19, 47, 1967.



- CHARCHAFIE R. J., BUSTOS FERNÁNDEZ L., PEREC C. J., GONZÁLEZ E. AND MARZI A. Functional studies of the parotid and pancreas gland in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 37, 863, 1974.
- GAJDUSEK D. C., GIBBS C. J. JR. AND ALPERS M. Slow, latent and temperate virus infections. *NINDB Monograph* 2, 1965.
- GAJDUSEK D. C., GIBBS C. J. JR. AND ALPERS M. Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* 155, 212, 1967.
- GIBBS C. J. JR., GAJDUSEK D. C., ASHER D. M. AND ALPERS M. P. Creutzfeldt-Jakob disease (Spongiform-Encephalopathy): Transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388, 1968.
- GRUNNET M. L. Nuclear bodies in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer's diseases. *Neurology (Minneap)*. 25, 1091, 1975.
- HIRANO A., MALAMUD N., KURLAND L. T. AND ZIMMERMAN H. M. A review of the pathologic findings in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: Motor Neuron Diseases. Edited by F. H. Norris Jr. and L. T. Kurland. Grune and Stratton. New York. 51-60, 1969.
- KEPES J. J., CHOU S. M. AND PRICE L. W. JR. Progressive multifocal leukoencephalopathy with 10-year survival in a patient with non-tropical sprue. *Neurology (Minneap.)* 25, 1006, 1975.
- LUFT J. K. Improvements in epoxi-resin in imbedding methods. *Journal of Biophysics and Biochemistry Citology*, 9, 409, 1961.
- MENKES J. H., ELIASSON S. G., AGNANOFF B. W. AND ARBOR A. Slow viruses and in-born metabolic errors. *Archives of Neurology* 21, 645, 1969.
- NORRIS F. H., AGUILAR M. J. AND OLDSTONE M. B. A. Tubular particles in a case of recurrent lymphocytic meningitis followed by amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (In press), 1975.
- OSHIRO L. S., CREMER N. E., NORRIS F. H. JR. AND LENNETTE E. H. Virus-like particles in muscle from a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology (Minneap.)* 26, 57, 1976.
- PATRIZI G. AND MIDDLEKAMP J. N. In vivo and in vitro demonstration of nuclear bodies in vaccinia-infected cells. *Journal of Ultrastructural Research* 28, 275, 1969.
- QUICK D. T. Pancreatic dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. In: Motor Neuron Diseases. pp 189-198. Edited by F. H. Norris Jr. and L. T. Kurland. Grune and Stratton. New York 1969.

- REYNOLDS E. F. The use of lead citrate of high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208, 1963.
- SPONZILLI E. E., SMITH J. K., MALAMUD N. AND McCULLOCH J.R. Progressive multifocal leukoencephalopathy: A complication of immunosuppressive treatment. *Neurology* 25, 664, 1975.
- ZEMAN O. AND KOLAR O. Reflections on the etiology and pathogenesis of sub-acute sclerosing panencephalitis. *Neurology (Minneap.)* 18, 1, 1968.
- ZIL'BER L. A., BAJDAKOVA Z. L., GARDAS'JAN A. N., KONOVALOV N. V., BUNINA T. L. AND BARABADZE E. N. Study of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Bulletin W. H. O.* 29, 449-456, 1963.
- ZURHEIN G. M. AND CHOU S. M. Sub-acute sclerosing panencephalitis. *Neurology (Minneap.)* 18, 146, 1968.