

ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

Em órgãos fetais — baço, pulmão e cérebro

MARIA EVANGELINA FERREIRA FONSECA
Professor Adjunto da UFRJ e PhD em Ciências

APARECIDA GOMES PINTO GARCIA
Patologista do Instituto Fernandes Figueira

ÂNGELA GONÇALVES DA SILVA
Microscopista Eletrônica do IM da UFRJ

RICARDO EDUARDO DE ALMEIDA MENDONÇA
NANCY FRIMER
Bolsistas do CPEG/UFRJ

RESUMO

Um estudo ultra-estrutural de casos de doenças congênitas foi realizado em três órgãos (baço, pulmão e cérebro). Partículas herpéticas foram observadas tanto no núcleo como no citoplasma dos órgãos estudados. Os aspectos ultra-estruturais foram destacados por seu caráter de importância no diagnóstico da infecção viral.

INTRODUÇÃO

O exame pós-morte de crianças congenitamente infectadas torna-se necessário a fim de se estabelecer a etiologia clínica do caso. O assunto, hoje em voga na literatura internacional, é de extrema importância, visto as sérias conseqüências que uma infecção intra-uterina pode acarretar para o feto, fazendo que as doenças congênitas se tornem um ônus para a Saúde Pública e, conseqüentemente, para a sociedade. Este estudo vem mesmo tornando-se prioritário naqueles países em que já houve controle da mortalidade infantil causada por doenças infecciosas.

Entre os vírus que acometem o feto está o citomegalovírus (CMV). Ele é responsável por uma sé-

rie de infecções severas, particularmente em recém-nascidos. As várias manifestações clínicas da doença de inclusão citomegálica (CID) compreendem: hepatoesplenomegalia, icterícia, anemia hemolítica, púrpura trombocitopênica, pneumonite, cório-retinite, doenças do sistema nervoso central, entre outras (Weller & Hanshaw, 1962; Medearis, 1964; Hanshaw & Dudgeon, 1978).

O método laboratorial para o diagnóstico da infecção congênita citomegálica é o da histopatologia pós-morte e a citologia esfoliativa de urinas (Fetterman, 1952). O isolamento do CMV em células de fibroblasto humano (Smith, 1956; Rowe, 1956) e a titulação de anticorpos neutralizantes ou fixadores do complemento (Weller *et al.*, 1960; Sever *et al.*, 1963) são métodos de rotina usados para o diagnóstico. Outros dois métodos podem ser utilizados: o de imunofluorescência (Hanshaw *et al.*, 1968) e o da imunoperoxidase (Kurstak & Kurstak, 1974). Durante os últimos anos, a detecção por microscopia eletrônica de partículas virais em espécimens clínicos tornou-se um método laboratorial excelente para o diagnóstico rápido de um grande número de viroses, entre elas a citomegalovirose.

No presente trabalho, descrevemos uma técnica de microscopia eletrônica utilizada na verificação do agente causal de infecções congênitas, em três casos examinados, e destacamos as particularidades morfológicas encontradas nos tecidos humanos congenitamente infectados, estabelecendo um padrão de lesões ultramicroscópicas que podem facilitar o diagnóstico de infecção citomegálica.

Trabalho realizado no setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia — Bloco I — CCS — Cidade Universitária. Caixa Postal 68040 — Rio de Janeiro-RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos clínicos

Três casos foram examinados; os órgãos fetais foram estudados histologicamente. Foram doados pela Dra. Aparecida Garcia e fazem parte da coleção do setor de Patologia do Instituto Fernandes Figueira. Na Tabela I têm-se detalhes destes casos.

TABELA I

DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES ESTUDADOS

Caso	Órgão estudado	Idade	Quadros clínicos e histopatológico
1	Baço	5 meses	Infecção sistêmica: pneumonia, hepatite, hipoplasia tímica, díplasia renal, fibrose pancreática, lesões do SNC e miocardite
2	Pulmão	3 meses	Infecção sistêmica: pneumonia, pancreatite, hepatite, hipoplasia tímica, meningoencefalite, nefrite
3	Cérebro	4 meses	Septicemia, nefrose vascular, pancreatite aguda, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite, pneumonite

Processamento do material para microscopia eletrônica

Utilizou-se a técnica descrita por Yunis *et al.* (1978), que consistiu em se usar material parafinado para a microscopia eletrônica. Observamos que aqui, neste caso, as alterações citológicas vistas ao microscópio eletrônico não podem ser descritas como tendo por causa o agente infeccioso; porém, as partículas virais ficam íntegras neste material, sendo observados a sua presença e os seus diversos aspectos morfológicos. A técnica consiste de dois processos: o primeiro, de desparafinação e hidratação do tecido; o segundo, de emblocamento para microscopia eletrônica.

Desparafinação e hidratação

Um pedaço do material parafinado foi obtido no micrótomo. Os materiais foram desparafinizados em xilol, por 20 minutos, lavados em solução salina fosfatada (PBS) e hidratados numa série de álcoois de 100 a 35%, durante cinco minutos cada.

O citomegalovírus é responsável por uma série de infecções severas, particularmente em recém-nascidos.

Emblocamento para microscopia eletrônica

Os materiais já desparafinizados e hidratados foram cortados em tamanho de 1 mm³ e fixados em glutaraldeído a 2,5%, em solução de cacodilato de sódio 0,2M, por 18 horas, a 4°C. No dia seguinte, foram lavados em solução de lavagem, consistindo de uma mistura, volume a volume, de sacarose 0,2M e tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2. Após dez minutos, os materiais foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, durante dez minutos, a temperatura ambiente, lavados em solução de lavagem por dez minutos e corados com solução saturada de acetato de uranila diluída em etanol. Após dez minutos, lavou-se o material com solução de lavagem e processou-se a desidratação do mesmo com uma série de álcoois de 35 a 100%, 20 minutos em cada; tratou-se com acetona por cinco minutos e, finalmente, embebeu-se o material em resina *polylite* 50% (em acetona), por 18 horas, a 4°C. No dia seguinte, embebeu-se o material por pelo menos duas horas em resina 100%. A seguir, foram emblocados e deixados a 60°C, por 48 horas. Finalmente, os blocos obtidos foram cortados em ultramicrótomo da LKB e corados com acetato de uranila, por uma hora, e em citrato de chumbo, por dez minutos. As secções ultrafinas foram observadas ao microscópio eletrônico.

RESULTADOS

Corpúsculos de inclusão intranucleares, como o observado na Figura 1, foram encontrados na grande maioria dos órgãos fetais estudados. De cada caso selecionamos para o estudo um órgão apenas. Estes corpúsculos de inclusão são comumente encontrados em casos de citomegalovirose.

O corte ultrafino dos órgãos estudados revelou a presença de partículas herpéticas no citoplasma (Figuras 2 e 7) e no núcleo (Figura 9). Os vírus no citoplasma encontram-se isolados (Figura 7) ou agrupados (Figura 2), com um tamanho aproximado de 145nm. As partículas encontradas no núcleo de uma célula do cérebro (Figura 9), isoladas umas das outras, têm 75nm de diâmetro. A cromatina está toda alterada e dispersa.

As partículas virais encontradas no citoplasma são maduras e contêm um nucleóide central, cir-



Figura 1 — Corpúsculo de inclusão intranuclear, típico de citomegalovírus. Aumento: 450 vezes.

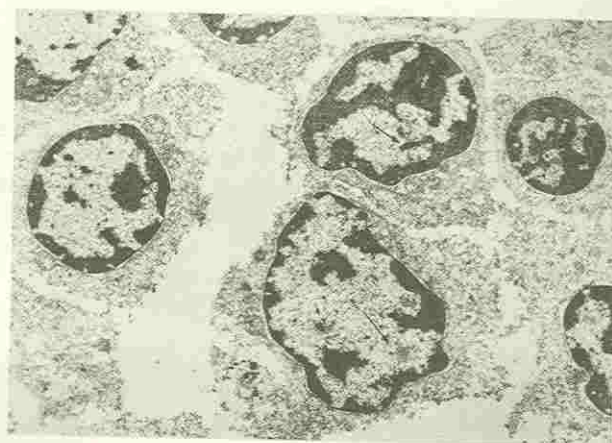


Figura 3 — Baço. Grânulos de pericromatina e estágios iniciais de formação de vírus (setas), com um arranjo paracrystalino (seta maior) no núcleo da célula. Aumento: 10200 vezes.

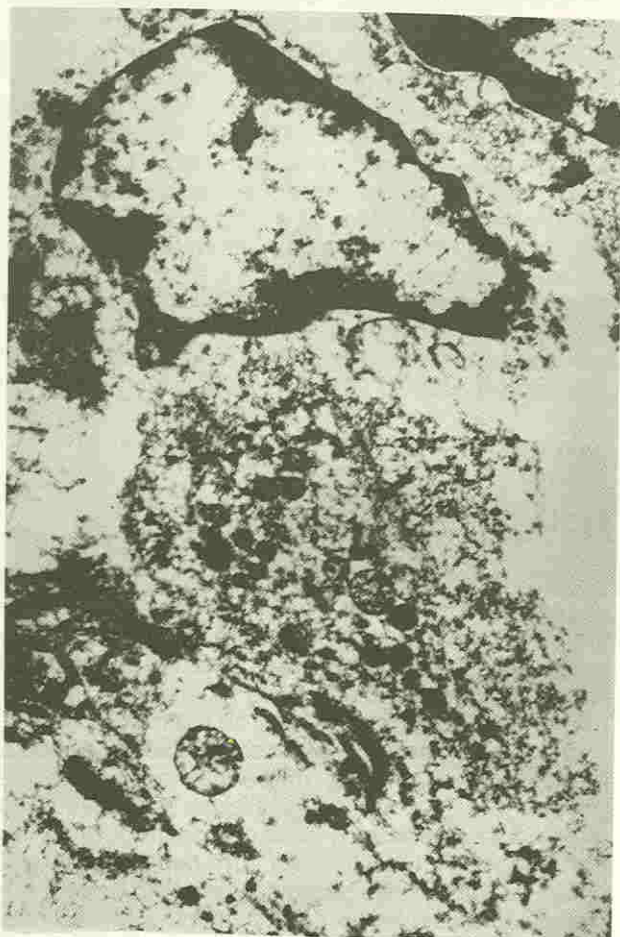


Figura 2 — Baço. Presença de partículas herpéticas maduras no debris celular, com 145nm de diâmetro. Aumento: 27000 vezes

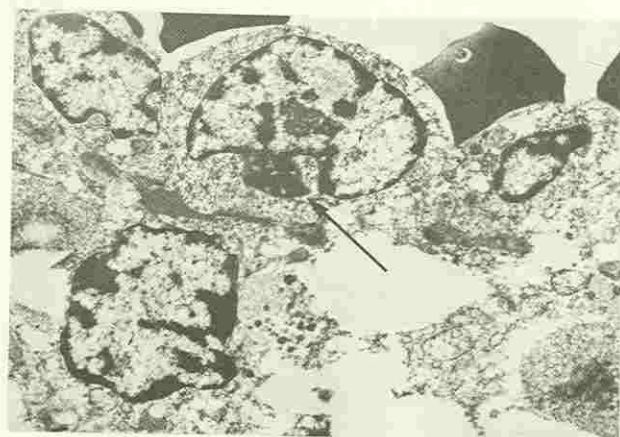


Figura 4 — Baço. Núcleos alterados. Notar corpúsculo de inclusão perinuclear constituído de material amorfo. Muitas áreas vazias são vistas na inclusão e parecem ser de partículas virais desaparecidas. Seta menor: estágios iniciais de replicação viral no núcleo. Aumento: 13000 vezes.

cundado por uma zona vazia e embebida em material amorfo denso (Figuras 2, 7 e 8).

Algumas alterações intranucleares com características de replicação viral foram também observadas (Figuras 3, 4, 5 e 6). Os nucléolos geralmente são bem demarcados, a cromatina mostra alguma marginação e, freqüentemente, notam-se interespçados nela grupamentos de partículas redondas ou alongadas, possivelmente estágios iniciais de formação de vírus (Figuras 3, 4, 5 e 6). Nenhuma partícula viral completa foi detectada nestes casos.

As Figuras 5 e 6 mostram parte de um núcleo com agregados de cromatina, bem como grânulos pequenos e densos e, às vezes, filamentosos, que

variam em espessura. Os grânulos têm aproximadamente 20nm de diâmetro.

As mesmas alterações nucleares descritas acima foram observadas na Figura 4. Mas o que mais se destaca neste órgão (baço) é a presença de um corpúsculo de inclusão perinuclear. As partículas virais na inclusão consistem de um espaço vazio, embebido de um material amorfo denso. Estas porções vazias parecem ser de vírus que desapareceram.

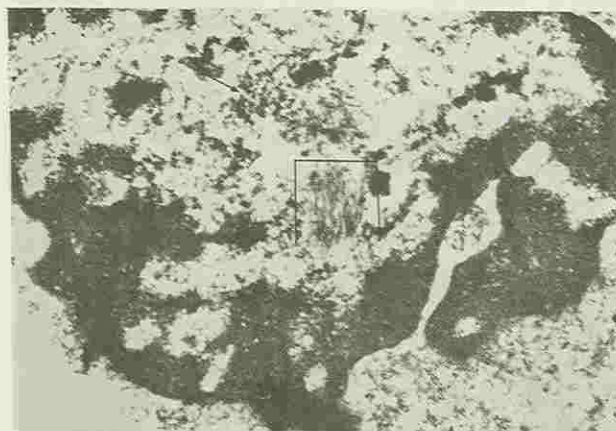


Figura 5 — Pulmão. Núcleo com agrupamento de grânulos densos (seta) e formas filamentosas. Aumento: 50000 vezes.

DISCUSSÃO

Como a microscopia do herpesvírus em casos clínicos é incomum (Bridges & Martin, 1974; Fornasier, 1974; Johannensen *et al.*, 1976), sendo a maioria dos trabalhos encontrados baseados em estudos feitos em culturas de células inoculadas pelo vírus (Morgan *et al.*, 1959; Ruebner *et al.*, 1965; Montplaisir *et al.*, 1972; Sarov and Abady, 1975) e em órgãos de animais infectados (Ruebner *et al.*, 1964), resolvemos destacar as particularidades morfológicas encontradas nos tecidos humanos congenitamente infectados, estabelecendo um padrão ultramicroscópico que possa facilitar o seu diagnóstico. Apesar de a técnica de microscopia eletrônica ser cara, ela é rápida e nos dá um resultado seguro.

Como bem demonstrado por Morgan *et al.* (1959), o núcleo das células infectadas com um vírus herpético sofre uma série de alterações, a maioria correspondendo a focos de replicação viral, como também pudemos observar nas Figuras 3, 5 e 6 notando, porém a ausência de partículas virais. Os autores anteriormente citados sugerem que isto se deve unicamente à maneira de como as secções ultrafinas foram obtidas, sugerindo que as

A microscopia eletrônica de partículas virais em espécimens tornou-se um método laboratorial excelente.



Figura 6 — Pulmão. Embora não existam partículas maduras, um foco inicial de formação de vírus aparece sob a forma de grânulos elétrôn-densos. Aumento: 30000 vezes.

estruturas encontradas a um determinado nível do corte necessariamente não refletem o estado real do núcleo inteiro. A despeito do problema de interpretação, a orientação espacial do vírus, com respeito a certos componentes da arquitetura celular, ocorre com frequência suficiente para ser significativa. Os agregados de grânulos relativamente uniformes de 20nm de diâmetro (Figuras 5 e 6), que são facilmente distinguíveis da cromatina marginada, reticular, estão geralmente associados à presença de vírus e foram descritos anteriormente

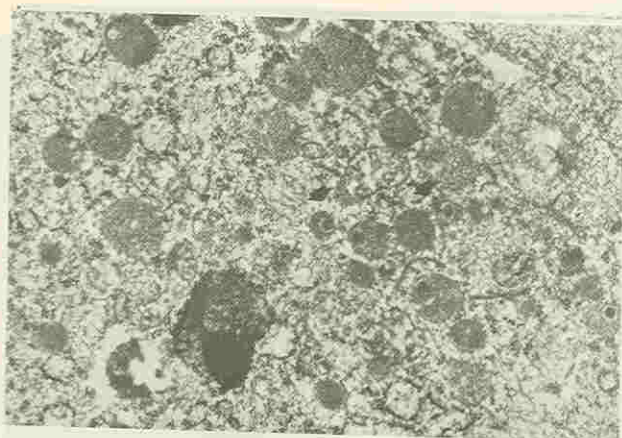


Figura 7 — Pulmão. Partículas virais maduras, intracitoplasmáticas e circundadas por material denso. Aumento: 38000 vezes.



Figura 8 — Pulmão. Partícula viral única, encontrada próxima a restos de membrana celular (seta). Aumento: 75000 vezes.

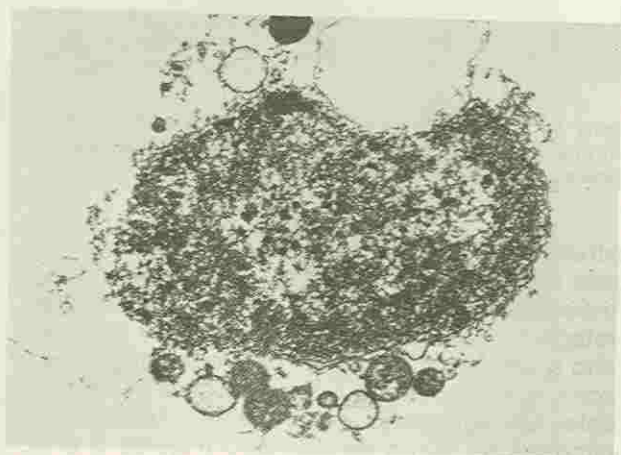


Figura 9 — Cérebro. Diversas partículas virais incompletas (75nm) no núcleo de uma célula do SNC. Aumento: 22000 vezes.

Corpúsculos de inclusão intranucleares foram encontrados na grande maioria dos órgãos fetais estudados.



Figura 10 — Criança (Caso 3) que apresentava pancreatite aguda, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite e pneumonite, entre outras.

por Morgan *et al.* (1959) e Ruebner *et al.* (1965). Segundo estes autores, tais grânulos representam o local de *template* para a replicação viral. Eles seriam, na realidade, o foco no qual os vários componentes da partícula viral se tornam espacialmente arranjados.

Os filamentos observados nas Figuras 4 e 5 foram descritos anteriormente por Morgan *et al.* (1959) e segundo estes autores representam apenas uma reação da célula à infecção viral.

Pelo observado nas Figuras, notam-se diversas etapas diferentes na replicação do vírus nas células

de um mesmo tecido. Isto representa para nós um exemplo de replicação lenta do vírus nestes tecidos estudados, lentidão esta possivelmente influenciada pela defesa celular. No entanto, já nos primeiros estágios de replicação viral, o núcleo é alterado e parece-nos que de maneira irreversível, levando conseqüentemente à morte celular.

A formação de uma rede eléctron-densa, relativa ao que se poderia chamar de inclusão intranuclear, é observada em diversos núcleos (Figuras 3 e 4), e estes, segundo Montplaisir *et al.* (1972), seriam compostos de DNA viral e antígenos virais.

As inclusões citoplasmáticas comumente encontradas na citomegalovirose foram por nós observadas (Figura 4). Segundo Ruebner *et al.* (1965), tais partículas estão contidas numa região do Golgi, que secreta lisozimas; a melhor explicação para a gênese da inclusão citoplasmática parece ser a de que esta matriz densa seja produzida no aparelho de Golgi hipertrofiado.

As partículas virais encontradas no citoplasma são bem maiores (145nm) do que as do núcleo (75nm), devido à presença do segundo envelope que elas adquirem. No entanto, a presença deste segundo envelope é freqüentemente difícil de resolver, porque em geral o espaço entre elas está obliterado por um material denso e amorfo (Figuras 2 e 7). A deposição deste material eléctron-denso altera também o tamanho das partículas observadas num mesmo tecido (Figura 7).

A técnica da desparafinização de material previamente embocado para histologia serviu-nos perfeitamente para a realização de um estudo retrospectivo e confirmativo de infecções congênitas causadas por citomegalovírus. Ressaltamos aqui

Maior riqueza de informações sobre a replicação de um vírus do grupo herpes em tecido humano foi encontrada no baço.

que, exceto as alterações nucleares observadas nos casos estudados e que foram compatíveis com aquelas encontradas por diversos autores já citados, não podemos salientar mais nenhuma alteração observada nas células infectadas, visto o tratamento drástico sofrido por estes tecidos. Porém as partículas virais ficam íntegras e estão sempre presentes nas células infectadas pelo vírus, constituindo, assim, a microscopia eletrônica um instrumento de confirmação de diagnóstico.

Não observou-se nenhum comportamento diferente dos órgãos estudados frente a infecção viral. No entanto, ressaltamos que entre o baço, o pulmão e o cérebro o primeiro foi o que apresentou maior riqueza de informações sobre a replicação de um vírus do grupo herpes em tecido humano.

Agradecimentos: Agradecemos ao CNPq a verba a nós concedida para a realização do presente projeto, bem como a FINEP e CPEG (UFRJ). A Paulo Roberto Rios nossos agradecimentos pela excelente ajuda técnico-fotográfica.

Referências bibliográficas com o autor:

Maria Evangelina Ferreira Fonseca
Rua Haroldo Lobo — Rua G, 264 — Ilha do Governador-RJ —
Tel.: 363-2804 e 260-9311(trabalho) — CEP 21931.

CURSO: "O ELETROCARDIOGRAMA"

— Enéas Ferreira Carneiro 1984 — São Paulo / Rio de Janeiro

Com sua 23.^a apresentação no Rio de Janeiro e 4.^a em São Paulo, o curso será ministrado no 2.^o semestre de 1984.

Rio de Janeiro: de 20/08/84 a 17/12/84, às 2.^{as} feiras, das 19h30 às 22h40, no Auditório "D" da Faculdade de Medicina Souza Marques.

Informações: Centro de Avaliação Cardiológica (das 14 às 20 h) — Tel.: (021) 257-6790.

6.^a Enfermaria da Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro, com D. Laura (das 8 às 12h) — Tels.: (021) 220-0878 e (021) 246-4180 — BIP 3 MBA.

São Paulo: de 10/08/84 a 22/12/84, às 6.^{as} feiras, das 9h30 às 22h40, no salão de Convenções "E" do Augusta Boulevard Hotel.
BIP 4JXA.