

## IDENTIFICAÇÃO DO HBsAg EM TECIDO HEPÁTICO PELAS TÉCNICAS DE ORCEÍNA E ALDEÍDO-FUCSINA DE GOMORI

Euzenir Nunes SARNO (1), Francisca Gonçalves de CARVALHO (2), Fernando Guerra ALVARIZ (3), Maria Consuelo Gondim SOARES (4) e Fátima de Barros FONSECA (5)

### RESUMO

Utilizando tecido hepático incluído em parafina, foi pesquisado HBsAg, segundo técnicas histoquímicas desenvolvidas por SHIKATA e outros. Estudou-se uma série de 120 casos de patologia hepática proveniente de biópsias de agulha e autopsia. Observou-se positividade em 21 casos. Células vítreas, descritas por POPPER & HADZYANNIS, foram encontradas em 17 dos 21 casos positivos. Sendo técnicas de fácil execução, poder-se-ia introduzi-las na rotina, contribuindo assim, para a determinação da frequência desses antígenos nas formas clínicas da infecção pelo vírus B da hepatite.

### INTRODUÇÃO

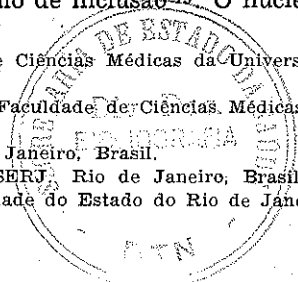
A pesquisa de Antígeno Australia<sup>1</sup> no tecido hepático desenvolveu-se a partir da identificação do HBsAg (antígeno da superfície) e HBeAg (antígeno "core"), por técnicas ultra-microscópica<sup>2,3,5</sup>. O componente "core" se encontra no núcleo de hepatócitos e parece que aí é formado, adquirindo no citoplasma um envoltório com especificidade morfológica de antígeno de superfície<sup>7,9</sup> (HBsAg).

Os estudos por imunofluorescência têm perfeita correspondência com os realizados por microscopia eletrônica<sup>11</sup>, demonstrando que os dois antígenos se localizam em áreas distintas na célula hepática<sup>5,6</sup>. Assim, nas hepatites agudas são observados tanto no núcleo como no citoplasma, e distribuídos difusamente no lóbulo hepático<sup>10</sup>. Nos quadros de imunossupressão<sup>8</sup>, nas leucemias<sup>18</sup>, nos transplantes<sup>12,13</sup> há predomínio do antígeno nuclear<sup>14</sup>. Em contraste, os portadores são apresentados fluorescência intensa do antígeno de

superfície<sup>14</sup>, sugerindo menor replicação viral no núcleo e abundante formação de proteína codificada pelo vírus no citoplasma<sup>3,4</sup>. Tais portadores são, quando estudados por imunoletromicroscopia, mostram o antígeno aranjado em grupamentos, no interior do retículo endoplasmático hipertrofiado e dilatado<sup>20,22</sup>.

Recentemente, estudos histoquímicos<sup>21</sup> possibilitaram a indicação do antígeno de superfície no hepatócito. POPPER<sup>19</sup> e HADZYANNIS<sup>10</sup> descreveram, em lâminas coradas pela HE, um aspecto peculiar de células contendo HBsAg, a que chamaram "ground glass cells". Essas células mostram citoplasma vítreo eosinofílico, finamente granular, quase homogêneo, contrastando com o aspecto granular e ligeiramente basofílico do hepatócito normal. As vezes essa área citoplasmática se apresenta circundada por halo claro semelhante a corpúsculo de inclusão<sup>19</sup>. O núcleo é

- (1) Titular da Disciplina de Patologia Geral e Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- (2) Auxiliar de Ensino da Disciplina de Patologia Geral e Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- (3) Chefe do Serviço de Clínica Médica do Hospital de Bonsucesso. Rio de Janeiro, Brasil.
- (4) Assistente do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central do IASERJ. Rio de Janeiro, Brasil.
- (5) Acadêmica de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.



normal e frequentemente duplo às vezes deslocado para a periferia. As células que contêm antígeno estão difusamente distribuídas, isoladas ou em grupo, sem predileção por nenhuma parte do lóbulo hepático.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas biópsias de 52 casos de hepatite aguda (51 habitual e 1 fatal), 29 de hepatite crônica (1 subaguda, 4 persistente e 24 crônica agressiva) e material de autopsia de 15 casos de cirrose, 12 de hepatoma (4 associados a cirrose), 8 de linfoma e 4 de leucemia (Tabela I). A pesquisa de HBsAg no soro pelas técnicas de contra imunoeletroforese e hemaglutinação foi realizada em 39 casos de hepatite aguda e 19 de hepatite crônica. Não foram realizadas pesquisas de HBsAg no soro dos demais casos incluídos no trabalho. Consideramos controles os pacientes com hepatite viral aguda com HBsAg negativo no soro (pesquisa feita nas primeiras semanas de icterícia) e portadores de hepatopatias não relacionadas a vírus. Tanto o material das biópsias como os de autopsia foram fixados em formol a 10% e incluídos em parafina. As lâminas foram coradas por hematoxilina eosina (HE), retículo de Gomori e tricrômico de Gomori. Para pesquisa de HBsAg, cortes de 5 $\mu$  foram corados pela orceína, aldeído-fucsina básica de Gomori e aldeído-fucsina básica associada ao metanil amarelo<sup>21</sup>. A técnica aldeído-fucsina de Gomori é a mesma descrita para fibras elásticas no "Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology"<sup>16</sup>. Como coloração de contraste podem ser usados o tricrômico de Gomori, o metanil amarelo ou Van Gieson, sendo que obtivemos melhores resultados com o pri-

meiro, com exposição do material por apenas alguns segundos ao corante. A técnica pela orceína segue as etapas do método de Hart para fibras elásticas<sup>16</sup>, com algumas alterações desenvolvidas pelo grupo de Mount Sinai<sup>10</sup>.

Utilizamos, para testar os corantes material comprovadamente positivo de duas autopsias, oferecido pelo Dr. M.A. Gerber, do Hospital Mount Sinai de New York.

### RESULTADOS

Obtivemos 21 casos positivos, assim distribuídos: 6 de hepatite viral aguda, 2 de hepatite crônica, 7 de cirrose e 6 de hepatoma (Tabela II). Nos casos considerados positivos podíamos observar células com massas intracitoplasmáticas, coradas em castanho pela orceína, e cor rosa-violeta quando coradas pela fucsina básica (Fig. 1). Células estreladas, isoladas ou em grupo mostravam citoplasma totalmente corado. As células positivas eram vistas predominantemente à periferia do lóbulo, junto aos septos de tecido conjuntivo e espaço porta. Podiam-se ver também células coradas isoladas, com aspecto de corpúsculo de Councilman (Fig. 3). Nas hepatites agudas todos os aspectos acima descritos foram encontrados. Nas hepatites crônicas e cirrose, não se encontraram corpúsculos acidófilos, e o aspecto de células vitras era mais freqüente (Fig. 4). Nos hepatomas, só se observou positividade no tecido hepático não tumoral, com exceção de um deles no qual houve envolvimento simultâneo nas células malignas (Fig. 2). Todos os casos de doenças linfoproliferativas foram negativos. HBsAg sérico foi pesquisado em 39 pacientes com HVA e 19 de hepatite crônica, encontrando-se 23 e 2 casos positivos, respectivamente.

TABELA I

Patologias diversas estudadas pelos métodos de coloração da orceína e aldeído-fucsina de Gomori

Patologia	Nº de casos
Hepatite aguda	52
Hepatite crônica	29
Cirrose	15
Hepatoma	12
Linfoma	8
Leucemia	4
Total	120

TABELA II

Evidenciação da distribuição histológica de HBsAg, pelas técnicas de orceína e aldeído-fucsina de Gomori

Patologia	Nº de casos HBsAg positivo
Hepatite aguda	6
Hepatite crônica	2
Cirrose	7
Hepatoma	6
Total	21

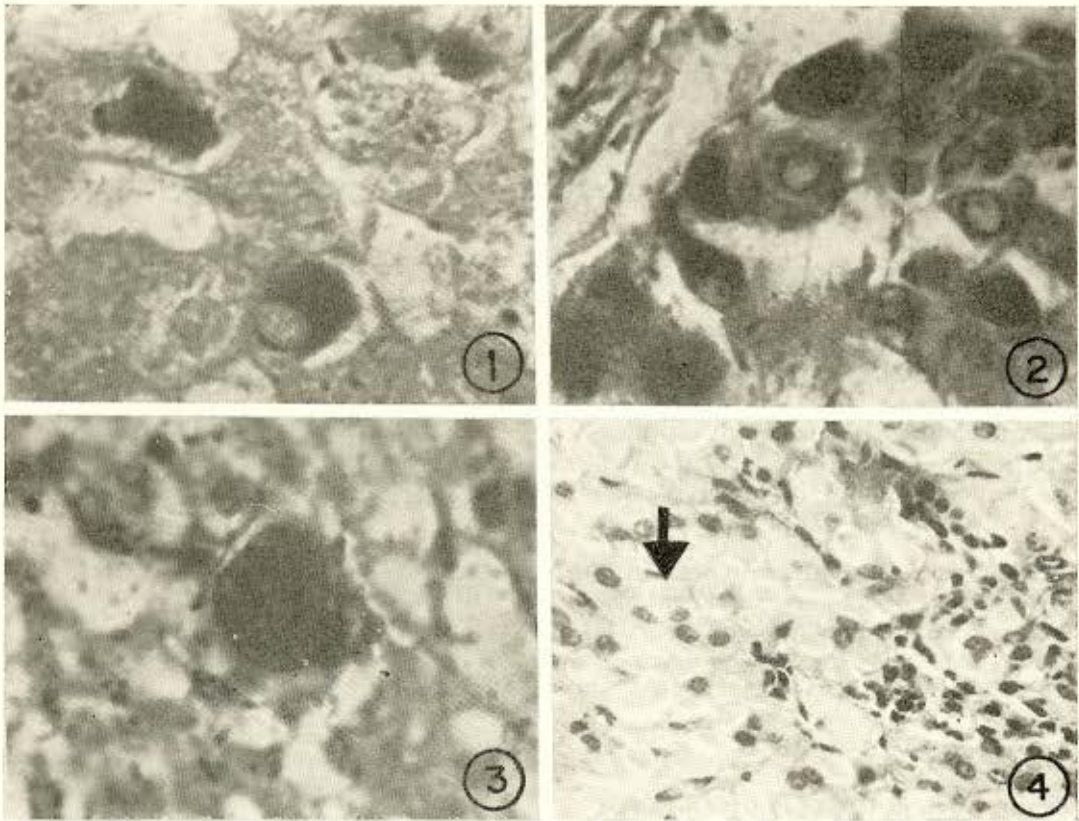


Fig. 1 — Célula com área citoplasmática positiva circundada por halo claro. Aldeido fucsina associada ao metanil amarelo, 1500 X. Fig. 2 — Inclusão citoplasmática positiva em célula neoplásica, Orceína, 600 X. Fig. 3 — Célula isolada positiva, Corpúsculo acidofílico em hepatite aguda, Aldeído-fucsina de Gomori, 1500 X. Fig. 4 — Células vítreas em hepatite crônica, H.E., 600 X.

### DISCUSSÃO

A identificação do HBsAg em tecido hepático tem colaborado no esclarecimento da patogênese das hepatopatias crônicas principalmente através de técnicas de imunofluorescência<sup>6,8</sup>. A utilização de técnicas para HBsAg em material fixado em formol facilitou e ampliou as possibilidades de identificação desse antígeno, já que sabemos das dificuldades de obtenção de amostras adequadas para imunofluorescência. SHIKATA<sup>21</sup> desenvolveu uma técnica para HBsAg, em material incluído em parafina, corando-o pela aldeido-fucsina e aldeido-tionina, que demonstraram especificidade pelas pontes dissulfeto do antígeno de superfície<sup>17,23</sup>. Utilizou também a orceína que se mostrou altamente específica não se sabendo, entretanto, até o momento, em que reações químicas se baseia essa positividade. A lite-

ratura tem confirmado a especificidade das técnicas, através de estudos comparativos, por imunofluorescência, microscopia eletrônica e imunoletromicroscopia em grande número de casos<sup>7,21</sup>.

Os padrões por nós identificados se assemelham aos descritos na literatura<sup>4,7,14</sup>. SHIKATA<sup>21</sup> relata positividade em corpúsculos acidófilos sem, entretanto, esclarecer se se tratava de hepatite aguda, o que ocorreu em alguns dos nossos casos. As células vítreas, ("ground glass cells") descritas por POPPER<sup>19</sup>, foram observadas na maioria dos nossos casos (80%). Notamos, entretanto, que nem todas as células positivas pela orceína ou fucsina básica, tinham aspecto de células vítreas na hematoxilina eosina. Sua relação com a presença de HBsAg não tem sido comprovada por todos os Autores<sup>21</sup>. Não observamos

TABELA III

Correlação entre a presença de HBsAg no soro e no tecido hepático pelas técnicas de orceína e fucsina básica

Patologia	HBsAg soro positivo HBsAg tecido positivo	HBsAg soro negativo HBsAg tecido positivo	HBsAg soro não pesquisado HBsAg tecido positivo	Total HBsAg tecido positivo
HVA	0	1	5	6
HC	1	0	1	2

HVA — Hepatite viral aguda — HC — hepatite crônica

correlação entre a presença de HBsAg no soro e no tecido. Com relação a hepatite aguda, dos 6 casos positivos no tecido, em cinco não havia sido pesquisado HBsAg e um fora negativo. Na hepatite crônica dos dois casos positivos no tecido só em um, HBsAg fora pesquisado e positivo (Tabela III).

Acreditamos que a utilização dessas técnicas, como método simples para identificação de HBsAg, pode auxiliar muito na determinação da frequência deste antígeno e sua relação com as formas clínicas da hepatite.

### S U M M A R Y

#### Identification of HBsAg in hepatic tissue trough orcein and Gomori's aldehyde fuchsin technics

We have investigated the presence of HBsAg in hepatic tissue in paraffin-mounted sections as related by Shikata and other Authors. Twenty one positive cases were found in 121 examined. Ground glass cells were seen in 17 cases. These technics are easily carried out and we believe them to be convenient as laboratory routine procedures.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUMBERG, B. S. — Polymorphisms of the serum proteins and the development of isoprecipitins in transfused patients. *Bull. New York Acad. Med.* 40: 377-386, 1964.
- DANE, D. S.; CAMERON, C. H. & BRIGGS, M. — Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated-hepatitis. *Lancet* 1: 695-698, 1970.
- EDINGTON, T. S. & RITT, D. J. — Intrahepatic expression of serum hepatitis virus associated antigens. *J. Exp. Med.* 134: 871-885, 1971.
- GERBER, M. A.; HADZIYANNIS, S.; VERNACE, S. & VISSOULIS, C. — Hepatitis B antigen in hepatocytes. *Lab. Invest.* 32: 251-256, 1975.
- GERBER, M. A.; HADZIYANNIS, S.; VISSOULIS, C.; SCHAFFNER, F.; PARONETTO, F. & POPPER, H. — Electron microscopy and immunoelectron microscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. *Amer. J. Path.* 75: 489-502, 1974.
- GERBER, M. A.; HADZIYANNIS, S.; VISSOULIS, C.; SCHAFFNER, F. & POPPER, H. — Immunofluorescence and electron microscopic studies of hepatitis B antigen (HBsAg) in liver tissue. *Gastroenterology* 64: 732, 1973.
- GERBER, M. A.; SARNO, E. N. & VERNACE, S. J. — Complement binding immune complexes in hepatocyte nuclei of patients with hepatitis B antigen positive chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 294: 922-925, 1976.
- GUDAT, F.; BIANCHI, L.; SONNABEND, W.; THIEL, G.; AENISHAENSLIN, W. & STALDER, G. — Pattern of core and surface expression in liver tissues reflects state of specific immune response in hepatitis B. *Lab. Invest.* 32: 1-9, 1975.
- HADZIYANNIS, S.; GERBER, M. A.; VISSOULIS, C.; MOSSOUIROS, A. & AFROUDAKIS, A. — Cytoplasmic localization of Australia antigen in the liver. *Lancet* 1: 976-979, 1972.
- HADZIYANNIS, S.; GERBER, M. A.; VISSOULIS, C. & POPPER, H. — Cytoplasmic hepatitis B antigen in ground glass hepatocytes of carriers. *Arch. Path.* 96: 327-330, 1973.
- HUANG, S. N. — Hepatitis-associated antigen hepatitis an electron microscopic study of virus-like particles in liver cells. *Amer. J. Path.* 64: 483-491, 1972.
- HUANG, S. M.; GROH, V.; BEAUDOIN, J. G.; DAUPHINEE, W. D.; GUTTMANN, R. D.; MOREHOUSE, D. D.; ARANOFF, A. & GAULT, H. — A study of the relationship of virus-like particles and Australia antigen in liver. *Hum. Path.* 5: 209-222, 1974.
- HUANG, S. N.; MILLMAN, I.; O'CONNELL, A.; ARANOFF, A.; GAULT, H. & BLUMBERG, B. S. — Virus-like particles in Australia antigen-associated hepatitis. *Amer. J. Path.* 67: 453-470, 1972.

---

SARNO, E. N.; CARVALHO, F. G. de; ALVARIZ, F. G.; SOARES, M. C. G. & FONSECA, F. de B. — Identificação do HBsAg em tecido hepático pelas técnicas de orceína e aldeído-fucsina de Gomori. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 20:1-5, 1978.

---

14. KRAWCZYNSKI, K.; NAZAREWICZ, T.; BRZOSKO, W. J. & NOWOSLAWSKI, A. — Cellular localization of hepatitis associated antigen in livers of patients with different forms of hepatitis. *J. Infect. Dis.* 126: 372-377, 1972.
15. LINGE, O.; KABOTH, U. & ARNOLD, R. — Liver histology in healthy carriers of Au-SH antigen of antibodies. *Med. Res. Progr.* 1: 4-5, 1971.
16. LUNA, L. G. — *Methods for connective tissue. Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3rd ed. New York, McGraw-Hill Book Company, 1968, 78-79.
17. MILLMAN, I.; LOEB, L. A.; BAYER, M. E. & BLUMBERG, B. S. — Australia antigen (hepatitis-associated antigen). Purification and physical properties. *J. Exp. Med.* 131: 1190-1199, 1970.
18. NOWOSLAWSKI, A.; BRZOSKO, W. J.; MADALINSKI & KRAWCZYNSKI, K. — Cellular localization of Australia antigen in the liver patients lymphoproliferative disorders. *Lancet* 1: 494-498, 1970.
19. POPPER, H. — The ground-glass hepatocyte as a diagnostic hint. *Hum. Path.* 6: 517-520, 1975.
20. SCHAFFNER, F. & GERBER, M. A. — Hepatitis B and hepatocellular particles. *Hum. Path.* 5: 125-126, 1974.
21. SHIKATA, T.; UZAWA, T.; YOSHIWARA, T.; AKATSUKA, T. & YAMAZAYI, S. — Staining methods of Australia Antigen in paraffin section — Detection of cytoplasmic inclusion bodies. *Japan. J. Exp. Med.* 44: 25-36, 1974.
22. STENGER, R. J. — Organelle pathology of the liver. The endoplasmic reticulum. *Gastroenterology* 58: 554-557, 1970.
23. VYAS, G. M.; RAO, K. R. & IBRAHIM, A. M. — Australia antigen (Hepatitis B antigen): A conformational antigen dependent on disulfide bonds. *Science (London)* 178: 1300-1301, 1972.

Recebido para publicação em 18/10/1976.