

**PATOGENIA DAS LESÕES HEPÁTICAS NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VÍRUS
ORPOUCHE (BeAn 1991): Análise compara-
tiva das curvas virêmica e de infectividade com
as alterações ultra-estruturais ***

Ronaldo de Araújo**
Francisco P. Pinheiro***
Marialva T. Araújo****
Dietrich Peters*****
Leônidas B. Dias*****

1 INTRODUÇÃO

O vírus Oropouche, inicialmente isolado em Trinidad, ANDERSON¹, tem sido encontrado na região Amazônica onde tem produzido inúmeras epidemias, PINHEIRO^{9,10,11}, nas quais dezenas de milhares de pessoas foram afetadas. As manifestações clínicas provocadas pela virose são de um processo infeccioso agudo febril que, em sua sintomatologia, chega a ser confundido com o da malária.

Trata-se, portanto, de vírus patogênico para o homem, de ampla disseminação na Região e sobre o qual precisamos de melhores conhecimentos a respeito do seu

RESUMO

Para estudar o mecanismo de produção das lesões hepáticas induzidas pelo vírus Oropouche (BeAn 1991), foram utilizadas concomitantemente, em animais experimentalmente inoculados, duas técnicas processadas no mesmo material e destinados a obter dados para comparação das alterações histológicas e ultra-estruturais com as curvas de infectividade e de viremia. O vírus determina lesões variadas e graves, que chegam até a necrose celular mesmo nas células que não são sede de replicação de partículas.

poder patogênico, o tipo das lesões que pode causar e, por fim, dos mecanismos pelos quais é capaz de produzir estas lesões.

No estudo do mecanismo de produção das doenças a vírus — a patogenia da patologia virótica — o estudo morfológico lesional em nível de microscopia ótica e eletrônica é passo fundamental e imprescindível na pesquisa porque define a natureza, a sede e a evolução das lesões. Como toda técnica, entretanto, tem suas limitações, ou seja, apresenta dificuldades interpretativas grandes quando se tem em mente a meta final da perfeita compreensão do porque e como se estabelecem e evoluem as doenças a vírus.

Assim torna-se necessário — e até imperativo — que as técnicas de microscopia ótica e eletrônica sejam coadjuvadas e complementadas por outras que permitam responder às inúmeras indagações que surgem com sua aplicação.

Dentro desta linha de pensamento estamos iniciando a comparação entre as lesões e sua evolução com as curvas virêmica e de infectividade no tecido hepático. O presente trabalho é relato dos primeiros resultados obtidos utilizando esta comparação nos estudos da infecção experimental com o vírus Oropouche.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vírus

Todo o trabalho foi desenvolvido utilizando a

* Trabalho executado no Núcleo de Patologia Regional e Higiene da Universidade Federal do Pará e no Instituto Evandro Chagas. Realizado com apoio do CNPq (Projeto SIP/02-006) e da FINEP. Integrante de pesquisa conjunta com o Instituto Bernhard-Nocht (Hamburgo), coordenada pela KFA-Jülich e pelo CNPq-Brasil.

** Prof. Adj. da UFPa, Departamento de Anatomia Patológica do CCS, Chefe de Seção no NPRH.

*** Virologista Chefe, Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Belém.

**** Prof. Aux. Ens., Departamento de Anatomia Patológica do CCS, Chefe de Laboratório no NPRH.

***** Chefe da Seção de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de Hamburgo, Alemanha.

***** Patologista Chefe do Setor de Experimentação Animal do NPRH.

amostra BeAn 19991, protótipo do vírus Oropouche no Instituto Evandro Chagas.

2.2 Inoculum

O material inoculado foi sempre 0,02ml de soro (diluído 1:10) de hamsters infectados, utilizando-se sempre a via intra-cerebral.

2.3 Animais

Para o presente trabalho foram utilizados hamsters de 23 a 30 dias de idade, da criação do Instituto Evandro Chagas, em um total de 18 animais.

2.4 Coleta do material

Como os animais começam a morrer espontaneamente a partir de 36 horas após a inoculação, selecionaram-se intervalos curtos (6 horas) entre as coletas, a fim de poder acompanhar com detalhes as alterações. Foram assim efetuadas coletas 6,12,18,24 e 36 horas após a inoculação, sacrificando-se 3 animais de cada vez. Este material corresponde à inoculação nº 10 no Registro de Inoculações mantido na Seção de Microscopia Eletrônica do NPRH.

2.4.1 Para microscopia ótica

Os animais foram sacrificados por decapitação e a fixação foi feita por imersão em formol neutro tamponado, removendo-se fatias de 2-3mm de espessura do fígado de cada um dos 3 animais sacrificados.

2.4.2 Para microscopia eletrônica

Imediatamente após a decapitação, fragmentos de 1-2mm foram removidos de duas fatias de fígado (com 1mm de espessura) de dois dos animais sacrificados. Cada fatia era imediatamente imersa no líquido fixador constituído de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato ou cacodilato, com pH de 7,2, obtendo-se os fragmentos de 1mm por seccionamento efetuado sob imersão.

Após a lavagem no tampão os fragmentos foram fixados por uma hora em tetraóxido de ósmio a 1%, desidratados com alcoois de concentração crescente e incluídos em Epon. Os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e nitrato de chumbo e examinados e fotografados em microscópio Siemens Elmiskop 101.

2.4.3 Para as curvas virêmicas e de infectividade

Após a infecção, dois animais eram sangrados por punção intra-cardíaca cada 6 horas, durante um pe-

ríodo de 36 horas e 0,1ml de sangue obtido era diluído em 0,9ml de solução fosfatada tamponada, contendo 0,75% de albumina bovina. Fragmentos de fígado eram macerados e suspensos a 1:10 na solução acima, centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos, aspirando-se o sobrenadante. Para as titulações as suspensões de sangue e de fígado eram submetidas a novas diluições e inoculadas em tubos contendo células de linhagem VERO, usando-se 4 tubos por diluição. Os tubos eram incubados a 35°C e as leituras realizadas a intervalos de 1 a 2 dias, até que o efeito citopático causado pelo vírus estabilizasse. Para o cálculo do título utilizou-se o método Karber, expressando-se os resultados sob a forma de \log_{10} da TCD₅₀.

3 RESULTADOS

Os estudos de microscopia ótica e eletrônica demonstraram ARAUJO⁴ o desenvolvimento de uma hepatite com necrose isolada de hepatócitos ou necrose focal, com participação das células de Kupffer do tipo da hiperplasia reacional. As lesões hepatocitárias aparecem já 6 horas após a inoculação do vírus, sendo a alteração mais saliente representada por complexo reagrupamento de organelas hepatocitárias.

A curva virêmica e a curva de infectividade no fígado mostram uma concentração virótica (Tabela 1 e gráfico 1) sempre maior no sangue do que no fígado, existindo uma concentração máxima no material retirado 18 horas após a inoculação (7,75 \log_{10} TCD₅₀ 0,1ml) seguida de queda mui discreta e nova ascensão, o que equivale dizer: a curva atinge seu ponto máximo em 18 horas e daí por diante praticamente não se altera.

Para maior facilidade de comparação dos dados obtidos eles foram colocados lado a lado, em seu desenvolvimento, na Tabela 2.

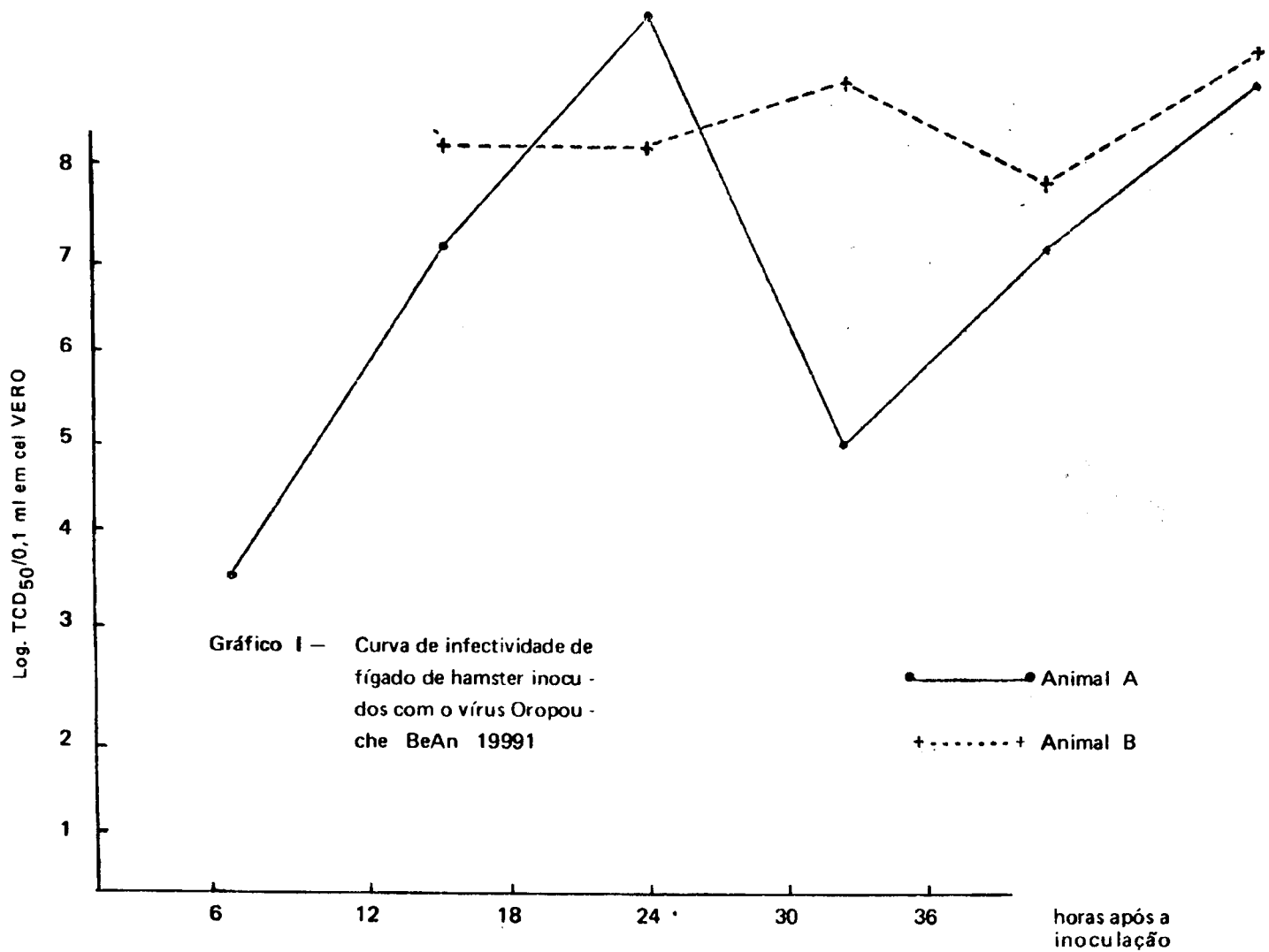
Tabela 1 - Curva virêmica e da infectividade em sangue e fígado de hamster inoculados com o vírus Oropouche (BeAn 19991)⁺

Hora P.I.	Nº animal	Sangue	Fígado
6 h	-	5,0 ⁺	3,5
12 h	A	6,5	6,0
	B	7,0	6,75
18 h	A	7,75	7,75
	B	7,25	6,75
24 h	A	7,5	4,5
	B	8,25	7,25
30 h	A	8,0	6,0
	B	7,75	6,5
36 h	A	7,5	7,25
	B	8,0	7,5

+ Hamster de 23-30 dias de idade (g 38274), inoculação IC com soro hamster (g 622548) em 10.3.76 - (Instituto Evandro Chagas)
+ + - Log. TCD₅₀/0,1 ml em tubos Vero

T A B E L A 2						
Comparação das curvas virêmica e de infectividade com as lesões ultra-estruturais e sua evolução em 12 hamster experimentalmente inoculados com vírus Oropouche						
H.P.i.	6	12	18	24	30	36
C. vir.	5	6,50 – 7,00	7,75 – 7,25	7,50 – 8,25	8,0 – 7,75	7,50 – 8,0
C. fig	3,5	6,00 – 6,75	7,75 – 6,75	4,50 – 7,25	6,0 – 6,50	7,25 – 7,5
Alterações ultra-estruturais	Reagrupamento de Organelas Diminuição de ribosomas Dilatação focal do RE Possível viroplasma	Mesmos achados de 6 h P.i. Aposição entre Re e mitocôndrias Conglomeraçãc periférica de cromatina Cel. de Kupfer túmidas e edematosas Neutrófilos no esp. Disse	Mesmos achados dos anteriores, com maior intensidade Vesículas do RE Figura tipo "finger print"	Mesmos achados dos anteriores, com maior intensidade Vesículas citoplasmáticas múltiplas Degeneração citoplasmática focal Marginação cromatínica	Necrose hepatocitária; modificações nucleares intensas Diminuição do RE Fagosomas e vesículas numerosas Cel. Kupfer túmidas, pálidas, com inclusões nucleares	Focos numerosos de necrose Muitos neutrófilos Intensa hipertrofia kupferiana Vesículas Citoplasmáticas

+ Retículo endoplasmático



4 .COMENTÁRIOS

São extremamente complexas e por isso mesmo mal conhecidas as possibilidades da inter-relação célula-vírus: as idéias de que o cerne (RNA ou DNA virótico constitui a porção infectante da partícula, de que a proteína do capsídio pode ser o determinante da susceptibilidade de espécie ou de órgão CORDS e HOLLAND⁵), de que existem receptores específicos da membrana citoplasmática para o vírus, além de muitas outras, são em sua maior parte sugeridas pelos resultados experimentais utilizando técnicas variadas que visam o esclarecimento destas relações.

Algumas vezes as alterações celulares e até e necrose celular parecem ser a consequência direta da multiplicação virótica nas células afetadas, COSSIO⁶. Em verdade muito do que hoje se rotula de citopatologia virótica corresponde apenas à patologia diretamente relacionada com a morfogênese virótica, estando quase desprezado o estudo das outras alterações e sua gênese. A replicação virótica pode ser potencializada pela presença de certas substâncias GREEN e BARON⁷. Estas e muitas outras sugestões ou comprovações são exemplos dos bons resultados advindos da utilização de técnicas simultâneas no estudo da patogenia das lesões viróticas.

São aqui analisados nossos resultados iniciais na tentativa de estabelecer a correlação entre a infectividade viral, as lesões e sua posterior evolução.

Em primeiro lugar a análise da curva de viremia e infectividade no tecido hepático confirma a sugestão obtida da análise dos cortes ultra-finos dos tecidos dos animais infectados ARAÚJO⁴ e da análise do sangue com a técnica do "negative staining" PETERS⁸: há maior quantidade de partículas no sangue do que no fígado, apoiando a sugestão de que a síntese virótica nos órgãos é acompanhada de uma rápida eliminação para o sangue.

O desenvolvimento de estruturas do tipo viroplasma é precoce, como acontece com o vírus BeAn 67949 ARAÚJO & BULLON,³ porém sua comparação com a curva de infectividade no fígado e a constatação de que esta se apresenta em sua fase inicial permite-nos maior certeza na interpretação da alteração morfológica e a possibilidade de rotulá-la como viroplasma.

A evolução lesional e a necrose celular tão intensas na infecção experimental pelo vírus Oropouche não estão diretamente relacionadas à síntese virótica pelas células afetadas, como acontece na infecção experimental com o vírus Piry ARAÚJO², pois é possível acompanhar as lesões celulares desde o início até a necrose em células isentas de partículas.

A detecção de focos de fluorescência no citoplasma e, de certo modo inesperado, no núcleo de hepatócitos de hamsters infectados com o vírus Oropouche,

mediante o emprego de conjugado específico para o agente sugere, entretanto, que algum componente virótico está sempre presente no desenvolvimento destas lesões. Se esta afirmativa é verdadeira, resta estabelecer qual é este componente e como ele está relacionado com a patogenia lesional. Para tal é necessário o desenvolvimento de técnicas de imunopatologia, próximo passo e próxima etapa de execução na continuação do trabalho ora apresentado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ANDERSON, C.R. et alii. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad. West Indies. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 10: 574-78, 1961.
- 2 — ARAÚJO, R. et alii. Piry virus-and arbovirus causing human febrile disease in the Amazon Region, Brazil. *Tropenmed. u. Parasit.*, 28: 262, 1977.
- 3 — ARAÚJO, R. & BULLON, A. Elektronenmikroskopische Befunde in der Lunge nach Infektion mit dem Arbovirus BeAn 67494 bei der Maus. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.*, 355: 238-52, 1972.
- 4 — ARAÚJO, R. et alii. Alterações ultra-estruturais no fígado de hamster após inoculação experimental com arbovírus Oropouche (Tipo BeAn 19991). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 20: 45-54, 1978.
- 5 — CORDS, C.H. & HOLLAND, J.J. Alteration of the species and tissue specificity of polio virus by enclosure of its RNA with the protein capsid of Coxsackie B1 virus. *Virology*, 24: 492-95, 1964.
- 6 — COSSIO, P. et alii — Ultrastructural and immunohistochemical study of human kidney in Argentine haemorrhagic fever. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.*, 368: 1-9, 1975.
- 7 — GREEN, J.A. & BARON, S. 5 iododeoxyuridine potentiation of the replication in vitro of several unrelated RNA and DNA viruses. *Science*, 190: 1099-101, 1975.
- 8 — PETERS, D. et alii. Caracterização do vírus Oropouche (BeAn 19991). Contribuição do estudo, com técnica de "negative staining", de sangue de hamsters experimentalmente inoculados. *Patologia e patogenia das Arboviroses*. Belém, 1978. p. 77-85.

- 9 — PINHEIRO, F. P. et alii. Epidemic Oropouche virus disease In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA TROPICAL E MALÁRIA, 8. Teeran. *Proceedings*. . . Teeran, 1968. p. 690-91.
- 10 — PINHEIRO, F.P. et alii. An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of Santarém, Pará, Brasil. *Tropen. Med. Parasit.*, **27**: 213-23, 1976.
- 11 — PINHEIRO, F.P. et alii. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.*, **12**: 15-23, 1962.

ABSTRACT

To study the mechanism of the production of hepatic lesions induced by the Oropouche (Be-An 19991) virus, two technics were used concomitantly in animals experimentally inoculated. These technics were processed in the same material and were intended to obtain data for comparison of histological and ultra-structural alterations, with infectiousness and virus statistical graphics. The virus causes varied and serous lesions, that may produce cell necrosis, even in cells that are not the head center of particles replication.

RÉSUMÉ

Pour étudier le mécanisme de la production des lésions hépatiques induites par le virus Oropouche (Be An 19991), ont été utilisées simultanément, dans des animaux expérimentalement inoculés, deux techniques réalisées dans le même matériel et destinées à obtenir des données pour la comparaison des changements histologiques et ultra-structuraux avec les courbes d'infection et de virulence. Le virus détermine des lésions variées et graves, qui arrivent jusqu'à la nécrose cellulaire même dans les cellules qui ne sont pas le siège de réplique de particules.