

HEPATITE B: A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA  
NA PATOLOGIA E ETIOPATOGENIA  
DA DOENÇA HEPÁTICA AGUDA E CRÓNICA

*Jorge de Oliveira Soares*

Cadeira de Bacteriologia e Virologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.  
Unidade de Microscopia Electrónica, Faculdade de Medicina de Lisboa.

RESUMO

No presente trabalho destaca-se o contributo da microscopia electrónica de transmissão para o esclarecimento de aspectos fundamentais da patologia, patogenia e etiologia da hepatite B. São mencionadas as alterações principais dos organelos dos hepatocitos no decurso da hepatite aguda e das formas crónicas da doença, e a sua relação com as perturbações da função hepática. São referidos os caracteres morfológicos dos componentes antigénicos do vírus da hepatite B (AgHBs e AgHBc), a sua localização intra-hepatocitária e a sua ocorrência nas diferentes formas de doença hepática com antigenémia HBs. É discutida a patogénese celular das alterações hepáticas na hepatite aguda e sugere-se a possibilidade de as relações intercelulares entre linfocitos e hepatocitos corresponderem à expressão morfológica de mecanismo imunológico contributivo para a evolução crónica da doença.

A microscopia electrónica tem sido aplicada ao estudo das hepatites, quer para o conhecimento das alterações subcelulares que ocorrem no decurso da doença, quer para a identificação de partículas e estruturas relacionáveis com vírus.

No presente trabalho, pretendem abordar-se alguns dos aspectos principais do conhecimento actual da hepatite B, obtidos com o emprego de técnicas de microscopia electrónica de transmissão:

- as alterações ultrastruturais das células parenquimatosas do fígado na hepatite aguda viral, e alguns aspectos relativos a formas crónicas;
- as partículas relacionadas com o vírus da hepatite B de localização intra-hepatocitária;
- a patogénese celular das alterações hepáticas nas formas agudas e crónicas da doença.

As conclusões que se apresentam baseiam-se na revisão da literatura, e no estudo de biópsias hepáticas de doentes com hepatite aguda e hepatite crónica, efectuado na Unidade de Microscopia Electrónica da Faculdade de Medicina de Lisboa, de 1974 a 1977.

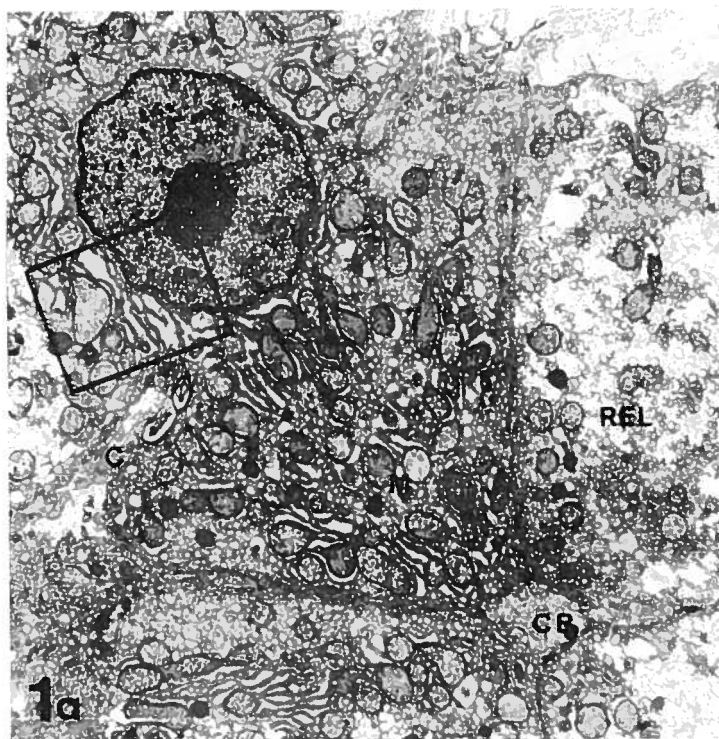


Fig. 1a — Microfotografia onde se observam porções de 4 células hepáticas, em um caso de hepatite aguda por vírus. O núcleo está aumentado de volume, a membrana nuclear, é irregular, o nucléolo é proeminente. Há dilatação e disrupção de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) e diferenças na densidade da matriz das mitocôndrias (M). Na célula situada à direita na figura, observa-se praticamente o desaparecimento do retículo endoplasmático rugoso e a exuberante proliferação e vesiculação do retículo liso (REL). Na confluência dos quatro hepatócitos observa-se um canaliculo biliar (CB) moderadamente dilatado, com diminuição do número de vilosidades. x 3900

### 1. A ultraestrutura do fígado na hepatite B

Os aspectos ultraestruturais do fígado na hepatite aguda por vírus são idênticos aos que se observam em outros processos inflamatórios agudos deste órgão, nomeadamente os produzidos por certas drogas. Tal como acontece na observação ao microscópio de luz também, em microscopia electrónica, não há caracteres distintivos, no quadro das alterações hepáticas, entre as hepatites B e as não B, designadamente as hepatites infecciosas. Existe uma relativa discrepância entre as alterações observadas ao microscópio óptico e as que se observam ao microscópio electrónico, sendo estas relativamente menos importantes que aquelas (Jézéquel e Steiner 1967; Schaffner 1970). A distribuição das lesões é variável, havendo zonas de marcadas alterações celulares,

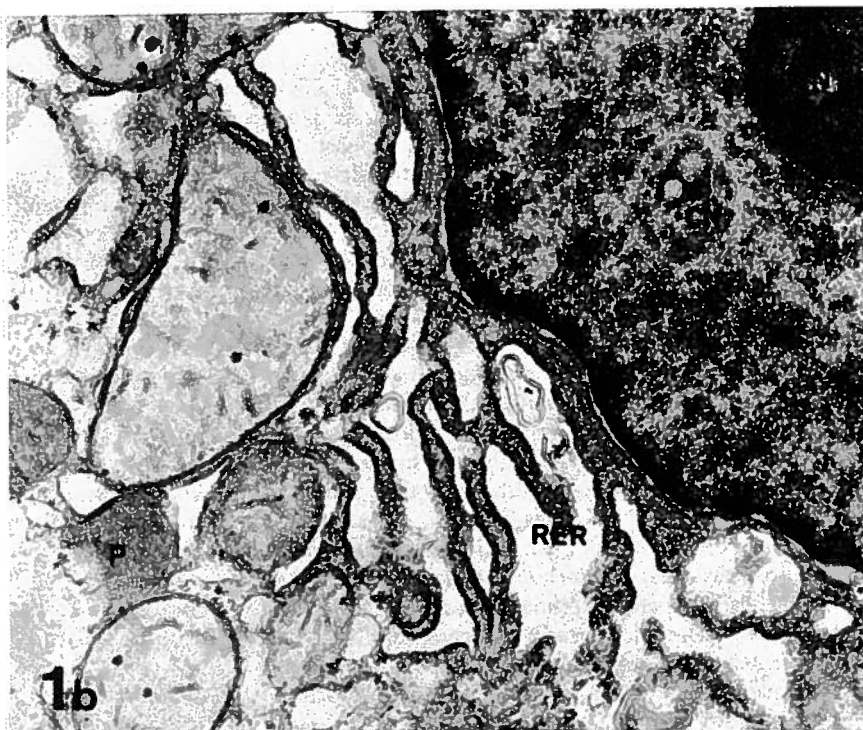


Fig. 1b — *Ampliação da região marcada na fig. 1a. Observa-se no núcleo um corpo nuclear de tipo IV. (Bouteille). x 23 150*

vizinhas de outras com células aparentemente normais, ou com lesões morfológicamente mínimas.

No núcleo dos hepatocitos, os achados mais frequentemente observados dizem respeito às alterações do seu volume e da configuração da membrana nuclear, a qual assume, em regra, um aspecto ondulado (figs. 1a e 1b). Este aspecto, que também ocorre em outras infecções virais, poderá relacionar-se com o aumento das interações núcleo-citoplasmáticas do hepatocito (Marsella 1972; Trump et al. 1976). A hipertrofia do núcleo é, classicamente, indicativa de processo regenerativo celular. Igual significado poderão ter o aumento das dimensões e a duplicação do nucléolo, bem como a presença, em número superior ao normal, de corpos nucleares, com estrutura por vezes muito complexa, a que se atribui, também, uma relação com o processo de replicação do vírus. (Scotto e Stralin 1976; Soares e Moura 1975).

No citoplasma do hepatocito as alterações mais importantes observam-se no retículo endoplasmático. O retículo rugoso apresenta dilatação e disrupção das cisternas, que ocorrem cedo no curso da doença (fig. 1b). É frequente a perda da relação habitual dos ribossomas com os perfis do retículo endoplasmático. Estas alterações têm sido relacionadas com perturbações intra-hepatocitárias da síntese proteica (Willis 1968; Ruebner e Slusser 1968). O retículo endoplasmático liso apresenta vesiculação, por vezes muito intensa. O aumento e a vesiculação do retículo endoplasmático algumas vezes é exube-

rante, originando grande aumento do volume da célula o que, em microscopia de luz, corresponde ao aspecto de *células em balão*.

As alterações das mitocôndrias são pouco marcadas, podendo, contudo, observar-se alterações do volume do organelo ou, ainda, formações cristalinas intramitocondriais.

Existe, em geral, um aumento do número de peroxissomas cujo significado no curso das alterações da doença não está ainda esclarecido (Schaffner 1970).

O complexo de Golgi está frequentemente dilatado, contendo material floculento, alterações estas que se relacionam com as perturbações da secreção biliar. Com frequência, particularmente nas formas ictericas, observam-se *figuras de mielina* ou inclusões lamelares (fig. 2), correspondentes a enrolamentos de membranas (fosfolipídicas?), em geral atribuídos aos efeitos da lesão celular subletal (Trump et al. 1976). Os processos de necrose das células hepáticas podem conduzir à lise e condensação das mesmas, que são eliminadas para os espaços vasculares. Apresentam-se, ao microscópio electrónico, como massas mais ou menos volumosas, densas aos electrões (fig. 3), e correspondendo aos corpos acidófilos, achado histológico habitual na hepatite aguda.

O edema e a redução do número das vilosidades do hepatocito, na sua superfície sinusoidal, são uma observação frequente na hepatite aguda (fig. 3). As alterações do pólo biliar da célula hepática, embora, em geral, importantes, parecem ser reversíveis e associam-se com a estase biliar e a icterícia. Essas alterações traduzem-se na dilatação, distorsão e perda das vilosidades, em maior ou menor grau, sendo os canalículos biliares, quando muito ectasiados, completamente desprovidos de vilosidades.

Na fase da recuperação celular encontram-se, com frequência, células com abundantes lisosomas, sobretudo formando corpos residuais com pigmento de lipofuscina e, menos frequentemente, hemossiderina.

Na sequência do processo regressivo, os hepatocitos tomam um aspecto que, do ponto de vista ultrastrutural, se não distingue do do fígado normal. Feixes de fibras colagénias, em regra escassos, nos espaços de Disse, são indicativos de processo cicatricial residual (fig. 5).

Nas formas que evoluem para a cronicidade, as alterações da célula hepática, dependem da fase clínica em que a biópsia hepática é feita: nas fases de agudização as imagens dos hepatocitos são sobreponíveis às da hepatite aguda (fig. 4); nas fases de doença não activa, os aspectos são sobreponíveis aos das fases de recuperação, mais ou menos próximos dos do fígado normal (Trump et al. 1976). Em todo o caso são frequentemente observadas alterações moderadas que, embora não específicas, se relacionam com o processo subjacente e a actividade da doença. Essas alterações são sobretudo do retículo endoplasmático, quer liso quer rugoso, da forma e volume das mitocôndrias e do número de peroxissomas e lisosomas.

## 2. Estruturas intra-hepáticas relacionadas com o vírus da hepatite B

Sabe-se que a partícula viral do vírus da hepatite B tem dois componentes: o componente interior e o de superfície, a que correspondem determinantes antigénicos distintos, respectivamente, AgHB<sub>c</sub> e AgHB<sub>s</sub>. Estes dois componentes são, provavelmente, sintetizados, a nível do fígado, em locais diferentes da célula hepática e têm diferente expressão morfológica ultrastrutural (Jokelainen et al. 1970; Gerber et al. 1972). Assim, formações esféricas, de cerca de 20 nm de diâmetro, dispersas no seio da cromatina nuclear ou em pequenos agregados de dimensões variáveis correspondem ao componente central da partícula viral (AgHB<sub>c</sub>) (fig. 6). São muito raramente observadas na fase aguda da doença, sendo mais frequentemente encontradas nas formas

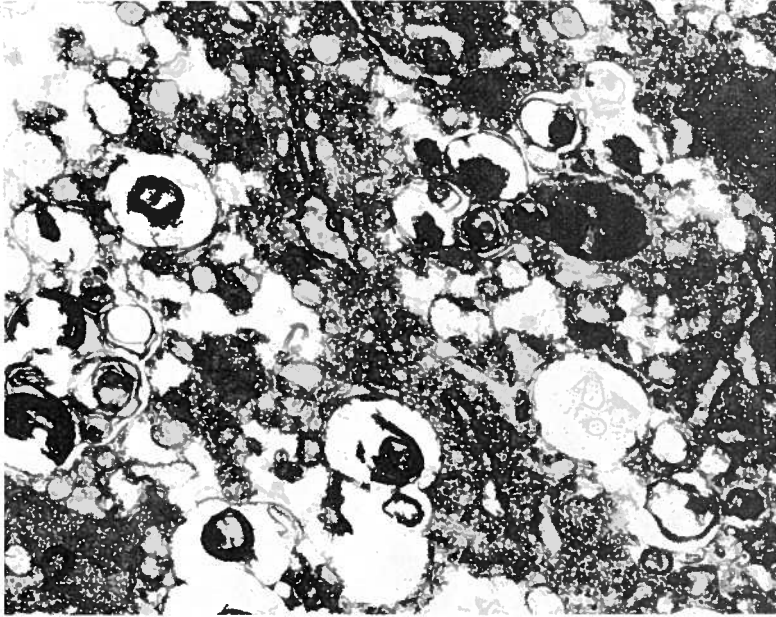


Fig. 2 — Porção de um hepatocito de um doente com hepatite aguda e icterícia. Numerosas «figuras de mielina». Porção de um complexo de Golgi dilatado, com material flocculento no interior das vesículas e cisternas. x 22 100

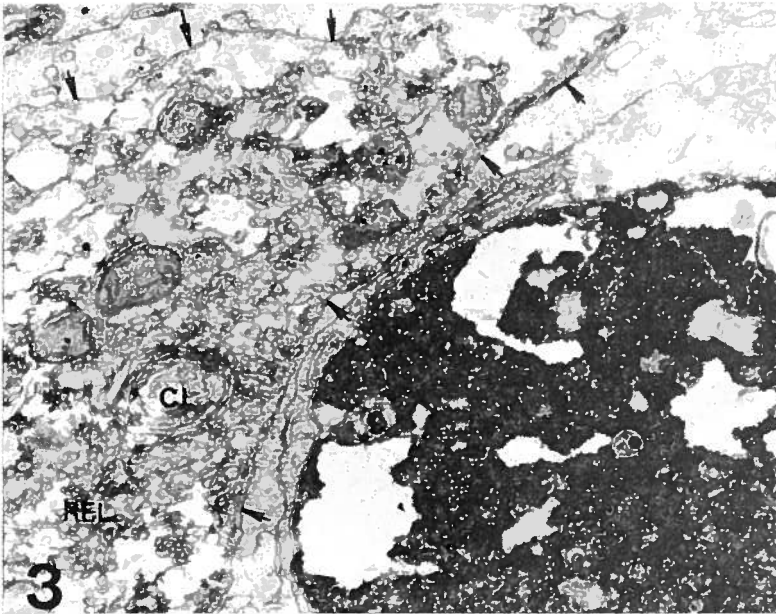


Fig. 3 — Massa osmiofílica contida numa célula macrofágica do sinusóide hepático (corpo acidófilo). A superfície do hepatocito está praticamente desprovida de vilosidades (setas). Hipertrofia do retículo endoplasmático liso (REL). Corpo lamelar (CL). x 11 600

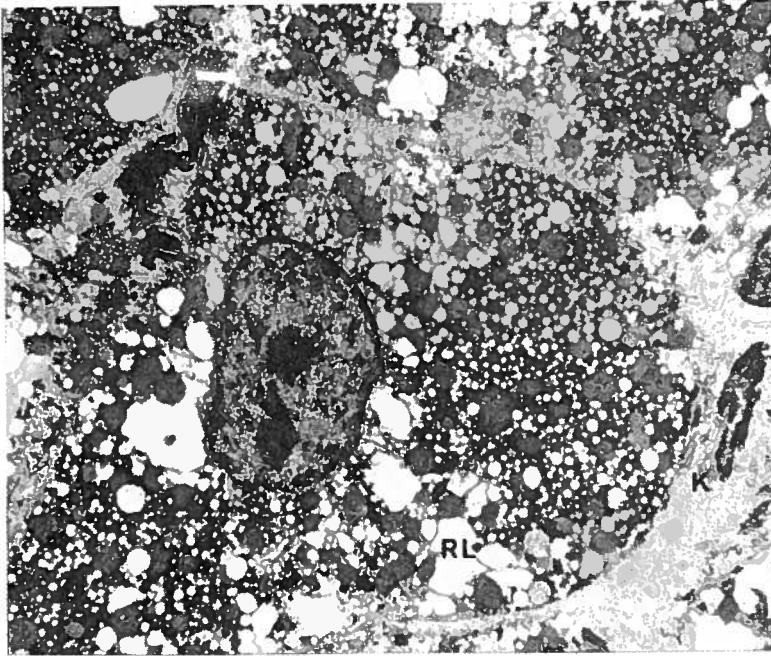


Fig. 4 — Intensas lesões celulares nos hepatocitos de um doente com reactivação clínica e laboratorial de hepatite crónica agressiva. Marcada dilatação vesicular do retículo endoplasmático (RL) Feixes de fibras colagénias (C). Célula de Kupffer (K). x 5500

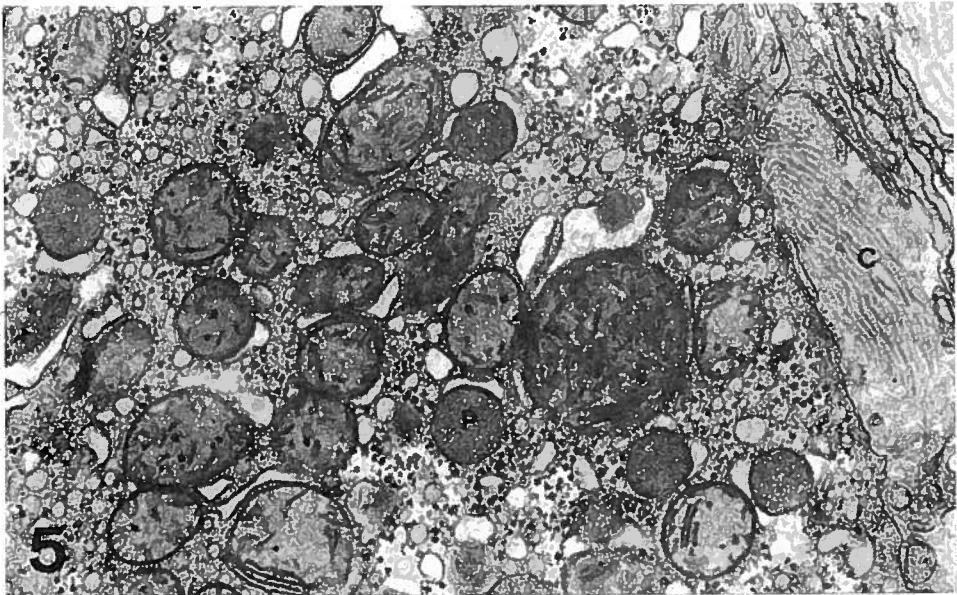


Fig. 5 — Pleiomorfismo das mitocôndrias. Cristas mitocondriais com perda da sua disposição habitual. Aumento do número de peroxisomas (P) Fibras colagénias no espaço de Disse (C). x 14 500

de doença hepática crónica associadas ao AgHB<sub>s</sub> e, somente, em alguns hepatocitos de portadores assintomáticos (Woolf e Williams 1976).

As partículas que a imunofluorescência e as técnicas de imunomicroscopia electrónica permitiram identificar como relacionadas com o Ag HB<sub>s</sub>, localizam-se no citoplasma da célula hepática (Gerber et al. 1975).

Essas partículas têm o aspecto de perfis tubulares e circulares, de comprimento variável e diâmetro de 20-24 nm, e localizam-se no interior das cisternas do retículo endoplasmático, o qual apresenta marcada proliferação. Quando em grande quantidade na célula hepática, esta adquire o aspecto descrito em microscopia óptica por *ground-glass*, tomando essas células coloração positiva pela orceína. Estes perfis tubulares devem representar a camada exterior proteica do vírus ou uma reacção da célula-hospedeiro ao antigénio viral (Almeida e Waterson 1975). As partículas Ag HB<sub>s</sub> estão presentes no citoplasma de menos de 5% dos hepatocitos na doença hepática crónica (hepatite crónica activa e cirrose hepática) e, em quase metade dos hepatocitos nos portadores assintomáticos do Ag HB<sub>s</sub> (Woolf e William 1976).

### 3. *A patogénese celular das alterações hepáticas na hepatite aguda e crónica*

As observações ao microscópio electrónico de biópsias humanas realizadas em diferentes fases da doença viral permitiram alargar a compreensão das alterações identificadas em microscopia de luz, e da fisiopatologia das estruturas celulares do fígado, nomeadamente dos hepatocitos.

A redução da função hepática na hepatite aguda é, não tanto o resultado da diminuição da massa do tecido hepático funcionante, como, sobretudo, a consequência do funcionamento deficiente da massa das células sobreviventes (Schaffner 1970).

A lesão dos organelos atrás descrita e as perturbações da secreção biliar e da circulação sanguínea, pela presença das células inflamatórias intra- e perisinusoidais, são responsáveis pelas perturbações da função hepática.

As alterações intrahepatocitárias observadas no decurso da doença permitiram aventar modelos explicativos dos fenómenos patogénicos que ocorrem na infecção viral aguda do fígado. Assim, segundo Trump (1976), a interacção entre vírus e célula levaria, provavelmente por mecanismo imunológico (mediado por complemento?, anticorpos?), a alterações da membrana celular do hepatocito com comprometimento dos mecanismos de difusão passiva, iónica e aquosa, e, também, dos de transporte activo. A interacção vírus-hepatocito, envolvendo primariamente lesão funcional da membrana celular, inicia uma sequência complexa de fenómenos (Quadro I) de que resultaria a característica disfunção hepatocelular desta doença. Os desvios anormais de iões através da membrana plasmática seriam, de acordo com Trump, predominantemente no sentido da entrada de sódio para a célula e subsequente entrada de água, sem a saída correspondente de outros iões, nomeadamente de potássio. Haveria um aumento de volume da célula, tendo como contrapartida morfológica a dilatação do retículo endoplasmático e o aspecto de balonização celular. Este facto também explicaria a obstrução canalicular parcial e a estase biliar e, portanto, o componente colestático observado em muitas formas de hepatite. O hepatocito dilatado poderia sofrer duas evoluções: ou a reparação celular, *restitutio ad integrum*, com saída de sódio da célula, entrada balanceada de iões potássio e restabelecimento da integridade morfofuncional da membrana da célula hepática, ou a morte celular, por rebentamento.

A condensação da célula hepática, por lise, que em microscopia óptica se traduz na presença de corpos acidófilos, poderia corresponder à saída de potássio da célula

## QUADRO I

Representação esquemática de fenómenos patogénicos que ocorrem  
ao nível da célula hepática na hepatite aguda  
(Adaptado e simplificado de Trump et al 1976)

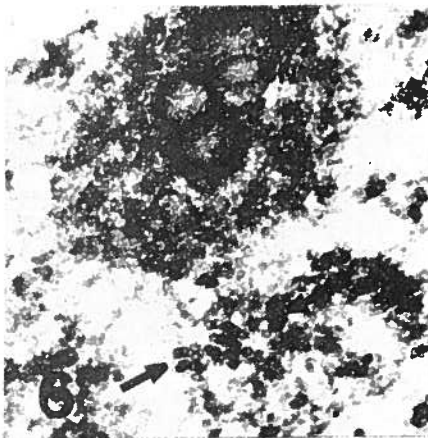
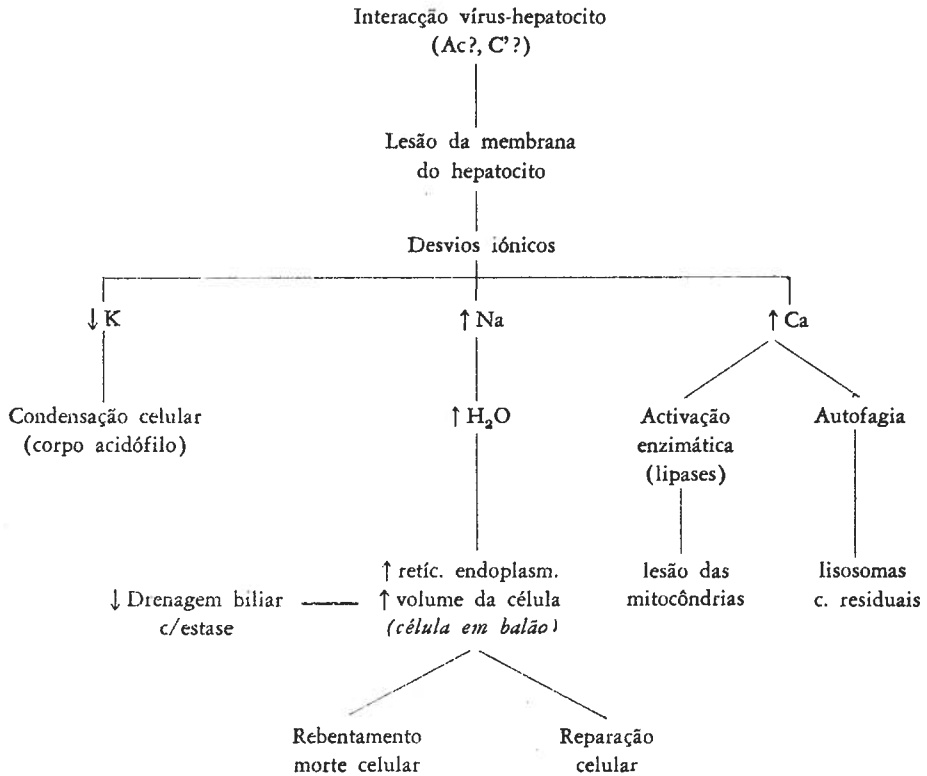


Fig. 6 — Formações esféricas de 20 nm (entre setas), correspondentes ao componente interior da partícula viral no núcleo de um hepatocito de um doente com hepatite crónica activa. Corpo nuclear (CN). x 24 000



Fig. 7 — *Hepatitis crónica activa.* Associação de linfocito com uma célula hepática que mostra alterações citoplasmáticas do retículo endoplasmático com marcada dilatação. Existe contacto de superfície entre as membranas celulares (seta). x 8500

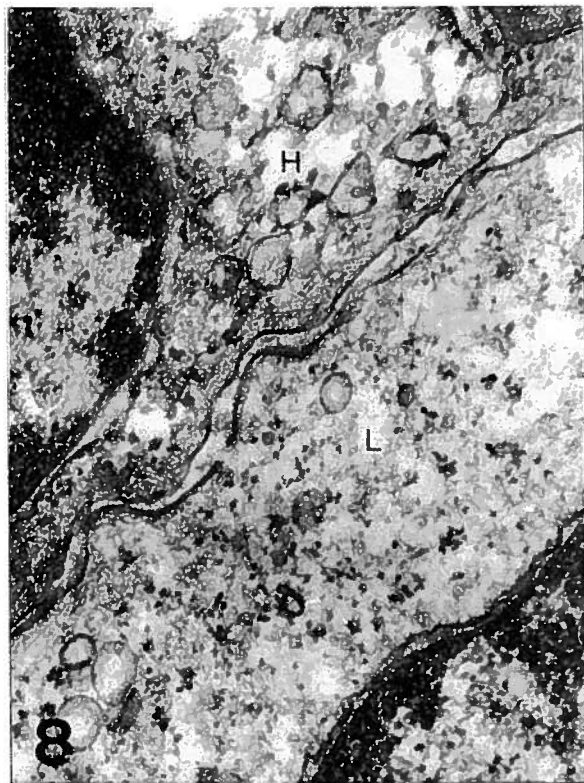
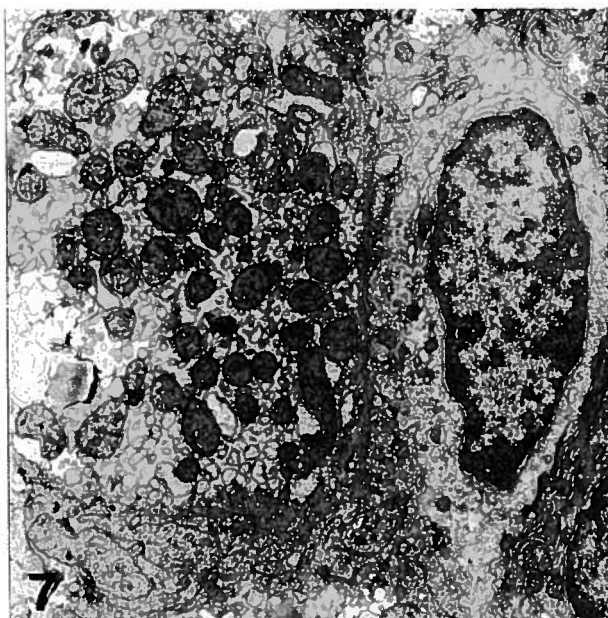


Fig. 8 — *Hepatitis crónica activa.* Zonas de contacto entre as membranas celulares de um linfocito (L) e de uma célula hepática (H). x 18 000

não contrabalançada pela entrada de iões sódio, fenómeno devido à perda dos mecanismos normais de transporte iónico. A célula lisada é eliminada para o compartimento vascular, e, em geral, fagocitada por células macrofágicas.

O cálcio, com desigual distribuição intracelular, acumula-se sobretudo nas mitocôndrias. Em virtude dos desequilíbrios iónicos nos compartimentos intra- e extra-celulares, libertar-se-ia para o citoplasma, despertando *movimentos* de membranas que originariam a formação de vacúolos autofágicos e, posteriormente, de corpos residuais. Igualmente, ao nível das próprias mitocôndrias, ocorreria a activação de fosfolipases que, actuando sobre a sua membrana interna, conduziriam à perda da integridade do organelo.

Quanto às formas evolutivas ou crónicas, o interesse dos investigadores tem-se centrado predominantemente nas técnicas imunológicas, no sentido da compreensão dos mecanismos de persistência e agravamento da doença hepática. Da morfologia tem-se colhido um contributo muito importante na definição dos quadros em que se divide a hepatite crónica, base da classificação actualmente adoptada.

Em trabalho recente, Kawanishi descreve a associação morfológica de linfocitos com hepatocitos, com inter-relações estruturais ao nível das membranas celulares respectivas (Kawanishi 1977). Em material que estudámos, referente a doentes com hepatite crónica activa, observámos, também, contactos íntimos de agregados de pequenos linfocitos com células hepáticas: contactos de superfície, invaginações, penetrações e *fusão* das membranas citoplasmáticas (Soares s. d.). É conhecido, *in vitro*, o alto grau de especificidade de linfocitos imunes para a lise de células-alvo (Gerottini e Brunner 1974). A associação morfológica de agregados de linfocitos com hepatocitos, na hepatite crónica activa, seria compatível com mecanismos imunológicos mediados por células, e responsáveis pela evolução crónica da doença. Contudo, serão necessárias observações subsequentes para confirmar, efectivamente, se se trata da manifestação estrutural de uma reacção imunológica, com intervenção de células mediadoras ou efectoras de citotoxicidade, dirigida contra a célula hepática, e responsável pela cronicidade da afecção.

## SUMMARY

In the present paper the contribution of transmission electron microscopy toward a better understanding of the fundamental aspects of the pathology, pathogenesis and etiology of hepatitis B is emphasized.

The main hepatic cell organelle changes occurring during the course of acute and chronic hepatitis are described and correlated with the hepatic function disturbances.

The morphological features of hepatitis B virus antigenic components are briefly described as well as their intra-cellular location and their occurrence in the different forms of HBsAg-associated liver disease.

The cellular pathogenesis of the hepatic cell changes in acute hepatitis is discussed. The possibility that the morphological association between lymphocytes and hepatocytes could be related to the immunological mechanism responsible for the chronic evolution of the disease is suggested.

## BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA JB, WATERSON AP: Hepatitis B antigen. An incomplet history. *Am J Med Sci* 270: 105, 1975.
- GERBER MA, SCHAFFNER F, PARONETTO F: Immuno-electron microscopy of hepatitis B antigen in liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 140: 1334, 1972.
- GERBER MA, HDJUYANNIS S, VERNACE S, VISSOULIS C: Incidence and nature of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. *Lab Invest* 32: 251, 1975.
- GEROTTINI JC, BRUNNER KT: Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv Immunol* 18: 67, 1974.
- JÉZÉQUEL AM, STEINER JW: Electron microscopy of liver biopsies and of transmissible agents from hepatitis patients. *Tschr Gastroenterologie Suppl.* 106: 3, 1967.
- JOKELAINEN PT, KROHN K, PRINCE AM, FINLAYSON NDC: Electron microscopic observations on virus-like particles associated with SH antigen. *J Virol* 6: 685, 1970.
- KAWANISHI: Morphologic association of lymphocytes with hepatocytes in chronic liver disease. *Arch Pathol Lab Med* 101: 286, 1977.
- MARSELLA RC: A comparative analysis of selected biological markers in the differentiation of Herpesvirus hominis types 1 and 2. *Thesis University of Maryland, Baltimore.* p. 203. 1972.
- RUEBNER BH, SLUSSER RJ: Hepatocytes and sinusoidal lining cells in viral hepatitis. An electron microscopic study. *Arch Pathol* 86: 1, 1968.
- SCHAFFNER F: The structural basis of altered hepatic function in viral hepatitis. *Am J Med* 49: 658, 1970.
- SCOTTO JM, STRALIN HG: Relationship between nuclear bodies and intranuclear invaginations in parenchymal liver cells of patients with viral hepatitis. *J Microsc Biol Cel* 25: 233, 1976.
- SOARES JO, MOURA MC: Aspectos ultra-estruturais da hepatite aguda por vírus. *J Médico* 88: 401, 1977.
- SOARES JO, MOURA MC: Nuclear bodies in the hepatic parenchymal cells in acute viral hepatitis. *Experientia* 31: 1210, 1975.
- SOARES, JO: Observações não publicadas.
- TRUMP BF, KIM KM, ISERL CA: Cellular pathophysiology of hepatitis. *Am J Clin Pathol* 65: 828, 1976.
- WILLIS EJ: Acute infective hepatitis. *Arch Pathol* 86: 184, 1968.
- WOOLF IL, WILLIAMS R: Significance of persistent HB<sub>s</sub> antigenaemia. *Brit Med J* 2: 807, 1976.

Pedido de Separatas: *Jorge de Oliveira Soares*  
*Unidade de Microscopia Electrónica*  
*Faculdade de Medicina de Lisboa*  
*Lisboa*