

## ASPECTOS EXPERIMENTAIS DA ESPLENOMEGALIA DA ESQUISTOSSOMOSE

Zilton A. ANDRADE (1)

### RESUMO

O emprêgo de uma combinação de técnicas histológicas, histoquímicas e imunocitoquímicas revelou que a esplenomegalia observada em camundongos infectados com o *S. mansoni* é conseqüência de: a) hiperplasia das células do sistema retículo-endotelial, com diferenciação plasmocitária e produção de  $\gamma$ -globulina, tal como ocorre nas respostas primária e secundária à injeção de antígenos; b) congestão venosa, que aparece tardiamente e se manifesta na dilatação dos seios venosos com hiperplasia e hipertrofia da trama reticulínica.

### INTRODUÇÃO

Em camundongos experimentalmente infectados com cercárias do *Schistosoma mansoni* observou-se um aumento progressivo do volume do baço a partir da segunda semana após a infecção. No intuito de melhor elucidar o aspecto e a natureza das alterações morfológicas que acompanham êste aumento de volume esplênico, os baços de camundongos infectados foram examinados, em diferentes períodos de evolução da doença, por intermédio de técnicas histológicas, histoquímicas e imunocitoquímicas.

### MATERIAL E METODOS

Camundongos brancos (Webster), de ambos os sexos, pesando em tórno de 20-25 g, foram infestados com cercárias de *S. mansoni*, em número aproximado de 50 cercárias para cada um. Os animais foram sacrificados semanalmente a partir da segunda até a décima semana após a infecção, sendo que quatro animais foram sacrificados após 18 semanas.

Dois a quatro animais foram sacrificados de cada vez, sempre acompanhados de um animal contrôle, não infectado.

Ao todo foram estudados 25 camundongos infectados e 9 contrôles. Os animais foram sacrificados por secção da aorta abdominal, após anestesia pelo éter e abertura da parede abdominal.

Para *estudo histológico* os fragmentos de tecido esplênico foram fixados em formol neutro a 10% e em líquido de Carnoy. As secções em parafina foram coradas pelos seguintes métodos: hematoxilina-eosina, anilina azul de Mallory para tecido colágeno, resorcina-fucsina de Weigert para fibras elásticas, verde de metila-pironina para estudo de basofilia citoplasmática. As secções foram também impregnadas pela prata segundo o método de Gomori para fibras reticulares.

Para *estudo histoquímico* as secções em parafina foram tratadas pelo método do PAS antes e depois de submetidas à ação da diástase.

Para o estudo do comportamento da fosfatase ácida os fragmentos de baço foram fi-

Trabalho realizado com auxílio dos National Institutes of Health (Grant RF-17) U.S.P.H.S.  
(1) Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia. Livre Docente de Anatomia e Fisiologia Patológicas.

xados em formol a 10% em solução de cloreto de cálcio a 1%, pH 7,2, e os cortes por congelamento foram submetidos a um método diazônico modificado<sup>3</sup>, utilizando-se o fosfato de  $\alpha$ -naftil como substrato e o hexazônio de pararosanilina como indicador.

Para estudo imunocitoquímico pequenos fragmentos de tecido esplênico foram congelados instantaneamente numa mistura de gelo seco e isopentano a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Foram cortadas secções de 5 micra de espessura em um criostato, as quais foram depois secadas ao vácuo e fixadas em acetona desidratada. As secções foram então lavadas em solução salina tamponada, pH 7, e postas em contato com algumas gotas de uma solução fluoresceïnada de anti- $\gamma$ -globulina do camundongo. Após lavagem em salina, as secções foram montadas em glicerina tamponada e examinadas num microscópio Zeiss com luz ultra-violeta, utilizando-se uma lâmpada Osram 200, dois filtros excitadores 2BG-12 e um filtro barreira 0G5.

A anti- $\gamma$ -globulina foi preparada em coelhos, usando-se como antígeno a  $\gamma$ -globulina do sêro do camundongo precipitada pelo sulfato de amônio e purificada através passagem pela coluna de celulose<sup>8</sup>. A fração  $\gamma$ -globulina do anti-sêro foi conjugada com o isotiocianato de fluoresceína<sup>11</sup>. Imediatamente antes do uso, o anti-sêro conjugado era adsorvido com pó de fígado de porco ou de medula óssea para se evitar a fluorescência não específica.

## RESULTADOS

*Animais contrôles* — Os aspectos histológicos observados nos baços destes animais foram comparáveis àqueles que têm sido descritos para o camundongo normal<sup>5</sup>.

A maior parte do tecido esplênico era constituída pela polpa branca. Esta era representada por nódulos de tecido linfóide no interior dos quais apenas algumas poucas células davam reação citoplasmática positiva para fosfatase ácida. Aí não se observavam células com fluorescência específica para  $\gamma$ -globulina.

Nas colorações de rotina os principais elementos celulares nos nódulos linfóides eram dotados de núcleo pouco denso, com cromatina granular e nucléolo bem evidente e com um halo citoplasmático levemente basófilo.

As figuras de mitose foram observadas raramente.

No espaço deixado entre os nódulos linfóides, a polpa vermelha se dispunha em estreitas faixas, com muitas hemácias difusamente distribuídas tanto nos seios venosos como nos cordões esplênicos. Estes últimos apresentavam muitas células que davam reação positiva para fosfatase ácida e que se distribuía de modo regular e difuso, por vezes enfileiradas entre as malhas de feixes reticulares.

Foram observadas algumas poucas células na polpa vermelha mostrando fluorescência específica para  $\gamma$ -globulina. No seio da polpa vermelha foram observados focos de mielopoese, identificados pela presença de hemácias nucleadas, leucócitos jovens e megacariócitos.

*Animais infectados* — O aumento progressivo do volume esplênico dos animais infectados está representado na figura 1. Nos

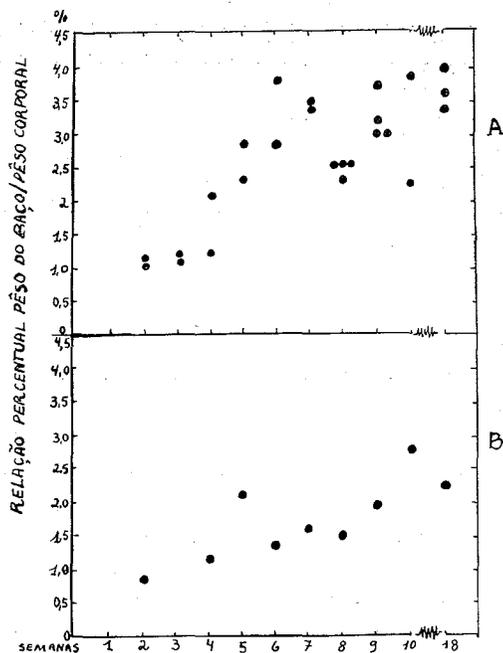


Fig. 1 — Pêso do baço em relação ao pêso corporal de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni* (A) e contrôles (B) segundo o tempo de evolução da infecção.

baços destes animais foi observada uma série de alterações, tanto na polpa vermelha como na branca, que mostraram uma intensificação progressiva com o passar do tempo.

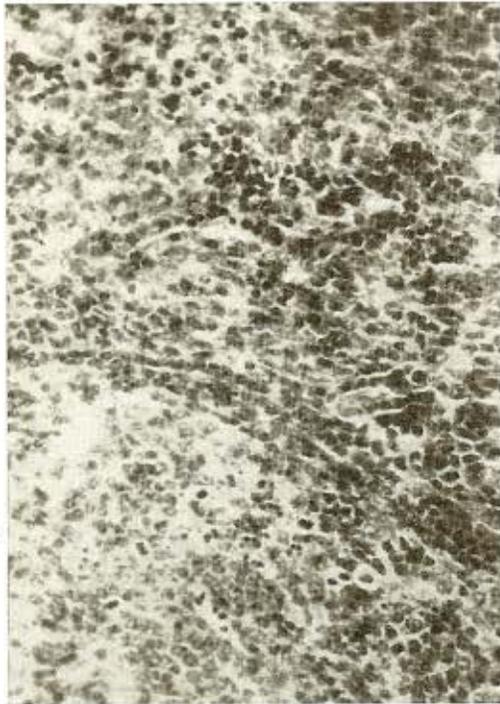


Fig. 2 — A polpa branca exibe muitas células em mitose. Uma estreita faixa de linfócitos delimita a periferia da polpa branca. Na polpa vermelha há numerosas células reticulares e focos de mielopoese. Animal com infecção de 3 semanas. (H.E. 200×).

a) *Polpa branca* — As modificações nos folículos eram representadas pela ampliação dos seus diâmetros e pelo apagamento dos seus limites periféricos. Nos estádios mais avançados havia atrofia progressiva dos folículos linfóides. As figuras de mitose nas primeiras semanas eram proeminentes (Fig. 2). Os nódulos linfóides tornavam-se menos compactos, ao tempo em que havia um certo grau de edema e o aparecimento de muitas células de citoplasma amplo e nitidamente basófilo. A técnica para fosfatase ácida demonstrava muitas células fosfatase-positivas, em contraste com o que foi observado nos controles. Raramente foi observada a presença de células cujo citoplasma se

impregnava com a anti- $\gamma$ -globulina fluorescente, ao ser empregada a técnica imunocitoquímica, principalmente nos estádios tardios da infecção.

b) *Polpa vermelha* — As alterações na polpa vermelha variaram segundo a fase da infecção. Da segunda até a oitava semana após a infecção, a polpa vermelha era muito celulosa, enquanto que daí até a décima oitava semana se tornavam proeminentes os aspectos congestivos. Nas fases mais iniciais havia hiperplasia e hipertrofia das células reticulares presentes nos cordões esplênicos e no revestimento dos seios venosos. Estes aspectos eram coincidentes com a presença de muitas células exibindo intensa reação citoplasmática para fosfatase ácida (Fig. 3), localizadas e distribuídas da mesma maneira que as células reticulares. A coloração para atividade fosfatásica fazia-se sob a forma de pequenos grãos difusamente distribuídos no citoplasma celular, não sendo observada coloração nuclear nas preparações.



Fig. 3 — Muitas células com reação positiva para fosfatase ácida localizadas no centro da polpa branca e difusamente distribuídas pela polpa vermelha. Infecção de 3 semanas. (Método diazônico de Barka. 100×).

As células que davam reação de fosfatase ácida mostravam tendência a formar pequenas coleções nodulares (Fig. 4), a partir da oitava semana após a infecção.



Fig. 4 — Células fosfatase-positivas na polpa vermelha mostrando tendência a formar pequenos acúmulos nodulares. Infecção de 10 semanas. (Método diazônico de Barka. 200×).

Ao lado das células reticulares apareciam muitas células que exibiam moderada ou intensa pironinofilia citoplasmática. A maioria exibia citoplasma abundante, denso e núcleo arredondado, ligeiramente excêntrico, com nítida membrana nuclear, cromatina dispersa em grãos grosseiros e nucléolo pouco evidente. Entre estas células se situavam alguns plasmócitos maduros, dotados também de intensa basofilia citoplasmática.

Os plasmócitos, bem como as células reticulares, por vezes exibiam material granular PAS positivo diástase-resistente, no citoplasma. Este último aspecto, como os demais citados, também mostrava intensificação progressiva com o progredir da infecção.

Os focos de mielopoese mostraram-se frequentes, sendo que os plasmócitos e as cé-

lulas plasmocitóides eram aí os elementos predominantes.

A técnica imunocitoquímica revelou um aumento progressivo do número de células com fluorescência citoplasmática verde-maçã, específica para  $\gamma$ -globulina (Fig. 5). Estas células foram identificadas como plasmócitos pela presença de núcleo excêntrico e também pela observação de suas características citológicas quando as secções tratadas pela anti- $\gamma$ -globulina fluoresceïnada foram posteriormente submetidas às colorações de rotina.

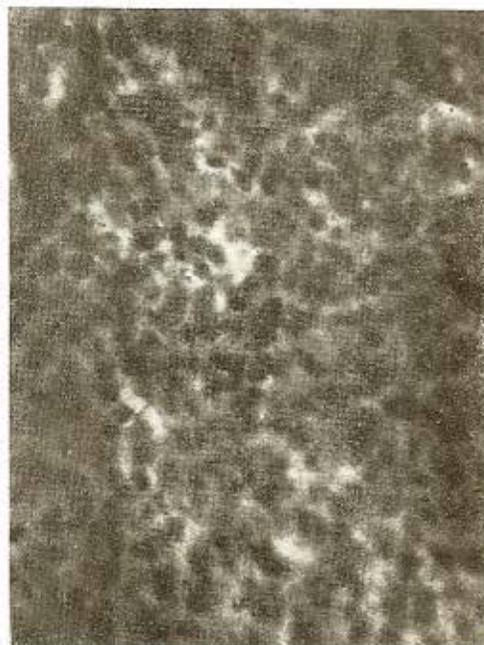


Fig. 5 — Secção de baço tratada com anti- $\gamma$ -globulina fluoresceïnada de camundongo. Aparecem muitas células com fluorescência específica na polpa vermelha. Infecção de 5 semanas. (200×).

As células contendo  $\gamma$ -globulina distribuíam-se difusamente pela polpa vermelha, formando por vezes pequenos focos de adensamento. Por volta da décima oitava semana após a infecção estas células se tornavam particularmente numerosas (Fig. 6). Nas secções examinadas sob luz ultra-violeta foi observado material amorfo com intensa

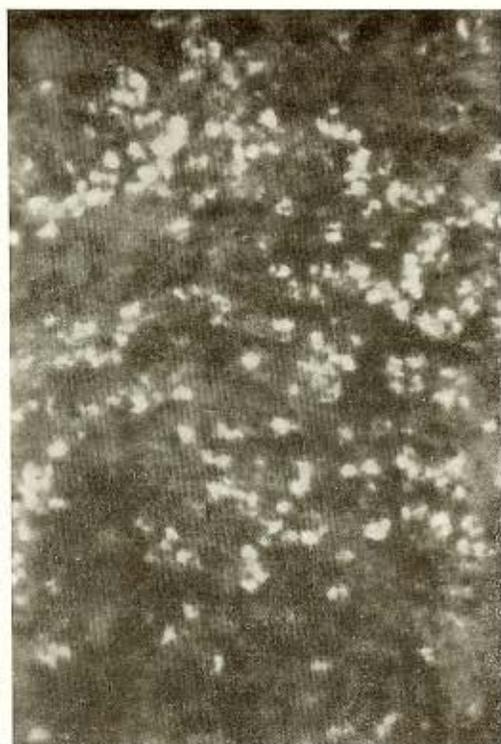


Fig. 6 — Seção de baço tratada pela anti- $\gamma$ -globulina fluoresceïnada de camundongo. Zona da polpa vermelha com numerosas células contendo  $\gamma$ -globulina. Infecção de 18 semanas. (250 $\times$ ).

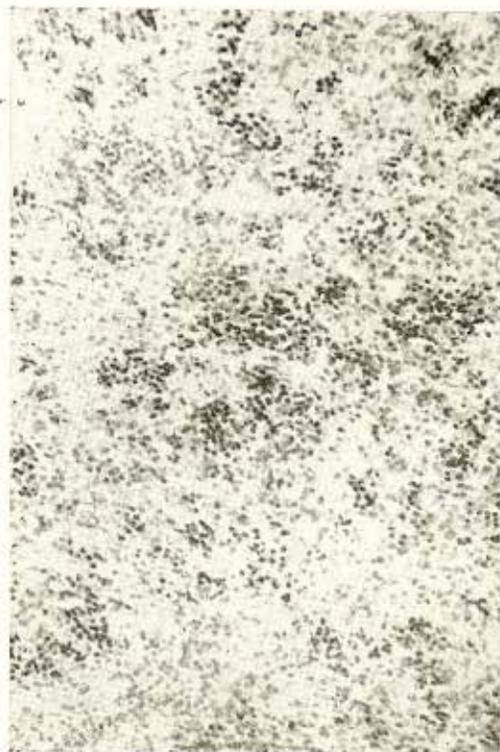


Fig. 7 — Seção de baço mostrando polpa vermelha muito alargada, com sinusóides congestos e vários focos de mieloperoxidase. Infecção de 18 semanas. (H.E. 100 $\times$ ).

autofluorescência avermelhada, identificado provavelmente como o pigmento de desgaste, lipofuscina.

A presença de ovos do *S. mansoni* foi registrada excepcionalmente. Quando tal ocorreu foram notados numerosos eosinófilos na polpa esplênica.

Nos animais sacrificados na décima e décima oitava semanas após a infecção, o quadro histológico era caracterizado pela preponderância da polpa vermelha sobre a branca. Isto se dava em virtude da dilatação e congestão dos seios venosos (Fig. 7) e de um certo grau de atrofia dos folículos linfóides. Coincidente com esta dilatação dos seios venosos se fazia um difuso espessamento da trama reticular, ao qual se acrescia nítido aumento numérico das fibrilas (Fig. 8). Por vezes havia espessamento colágeno das paredes dos seios venosos e das trabéculas esplênicas. Não foram observadas lesões vasculares evidentes.

#### COMENTÁRIOS

Vários autores, baseados em estudo de material humano<sup>6,12</sup> ou em observações experimentais<sup>9</sup>, têm sugerido que a esplenomegalia da esquistossomose surge em consequência da atuação de dois fatores fundamentais: a) congestão venosa dependente da hipertensão portal; b) hiperplasia dos elementos do sistema retículo-endotelial do baço. O presente estudo vem em apoio desta sugestão. A utilização das técnicas histoquímicas e imunocitoquímicas permite caracterizar melhor o tipo e a natureza das alterações morfológicas que condicionam o aumento do volume esplênico. A proliferação de células do sistema retículo-endotelial (células reticulares) é posta em evidência pela demonstração de atividade fosfatásica ácida no citoplasma destas células. A fosfatase ácida, assim como muitas outras hidrolases com ótimo pH ácido, parece estar contida no interior de organelas denomina-



Fig. 8 — Secção de baço mostrando hiperplasia e hipertrofia da trama reticulínica. Infecção de 18 semanas. (Método de Gomori, 300X).

das lisosomas<sup>13</sup>. Os lisosomas estão presentes em algumas células epiteliais, mas as células do sistema retículo-endotelial são particularmente ricas nestas organelas. BARKA *et al.*<sup>4</sup> sugeriram que o sistema retículo-endotelial poderia ser definido como aquele formado por células dotadas de um sistema de lisosomas altamente desenvolvido. Desta maneira, a caracterização das células reticulares, pela demonstração da atividade fosfatásica ácida, parece ser um meio mais adequado que aquele baseado no estudo de características citológicas nas colorações de rotina ou na demonstração de metalofilia<sup>10</sup>, que depende de um método de resultados inconstantes e que poderá apresentar artefatos. Também o método diazônico que foi empregado produz resultados mais constantes e com melhor localização do que os que são obtidos com a técnica original de GOMORI<sup>3</sup>.

O camundongo infectado com o *S. mansoni* exibe, de maneira precoce, intensa e

continuada, uma proliferação dos elementos retículo-endoteliais do baço, tanto na polpa vermelha como na branca. Em ambos os locais tal proliferação acompanha-se do aparecimento de muitas células com pironinofilia citoplasmática e estas células exibem vários graus intermediários de diferenciação no sentido plasmocitário. Também pode ser observado o aparecimento de material PAS positivo no citoplasma de algumas células proliferadas. Estes achados se superpõem àqueles de TEILUM<sup>14</sup> que, ao fazer injeções repetidas de antígenos, verificou um ciclo de secreção de material PAS positivo nas células reticulares. Ao lado destes achados, a demonstração imunocitoquímica de que há um aumento progressivo de células plasmáticas contendo  $\gamma$ -globulina nos cordões esplênicos, permite-nos deduzir que o estímulo aos elementos do sistema retículo-endotelial (resultando em proliferação de células reticulares, diferenciação plasmocitária e produção de  $\gamma$ -globulina) se faz sobre uma base imunológica. Realmente, o quadro observado é semelhante ao que tem sido descrito nas respostas primária e secundária do tecido linfo-reticular do gânglio linfático<sup>7</sup> e do baço<sup>10</sup> à injeção de antígenos. O presente estudo não determina que tipo ou tipos de antígenos estão em jôgo nos camundongos infectados pelo *S. mansoni*, mas é bem provável que eles resultem dos produtos do parasito. Recentemente foi demonstrado, com métodos imunocitoquímicos, a presença de material altamente antigênico no ovo e no *S. mansoni* adulto<sup>2</sup> e, histoquimicamente, foi verificado que o principal componente antigênico do ovo é provavelmente de tipo polissacáride complexo<sup>1</sup>.

Os aspectos congestivos, dependentes da instalação da hipertensão portal, só se tornaram morfológicamente evidentes no nosso material nos períodos mais tardios da infecção. A distensão dos seios venosos pelo sangue tornou proeminente a polpa vermelha e obscureceu as modificações celulares observadas nas colorações de rotina. O espessamento da trama reticulínica parece ter-se dado em consequência da distensão dos seios venosos pela congestão. Estes aspectos congestivos são interpretados como de

grande importância na patogenia da esplenomegalia, apesar do seu aparecimento tardio.

SUMMARY

*Experimental aspects of schistosomotic splenomegaly.*

Histological, histochemical and immunocytochemical techniques applied to an investigation on the nature of the splenic changes seen in *Schistosoma mansoni* infected mice, demonstrated that the splenomegaly present was due to: a) Hyperplasia of reticulo-endothelial cells, followed by plasma cell differentiation and the production of  $\gamma$ -globulin (antibodies); a reaction apparently similar to the primary and secondary responses observed in lympho-reticular tissue following injections of antigens; b) Chronic passive congestion due to portal hypertension, a late change inducing sinus engorgement and hypertrophy and hyperplasia of reticular fibrils.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, Z. A. & BARKA, T. — Histochemical observations on experimental schistosomiasis of mouse. (A aparecer no Am. J. trop. Med. & Hyg.).
2. ANDRADE, Z. A.; PARONETTO, F. & POPPER, H. — Immunocytochemical studies in schistosomiasis. Am. J. Pathol. 39:589-598, 1961.
3. BARKA, T. — A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. Nature, London 187:248-249, 1960.
4. BARKA, T.; SCHAFFNER, F. & POPPER, H. — Acid phosphatase and reticuloendothelial system. Lab. Invest. 10:590-607, 1961.
5. DUNN, T. B. — Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasm. J. Nat. Cancer Inst. 14:1281-1432, 1954.
6. KOPPISCH, E. — Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. VI. Morbid anatomy of the disease as found in Puerto Ricans. Puerto Rico J. pub. Health & trop. Med. 16:395-455, 1941.
7. LEDUC, E. H.; COONS, A. H. & CONNOLLY, J. M. — Studies on antibody production. II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of rabbit. J. exper. Med. 102:61-72, 1955.
8. LEVY, H. B. & SOBER, H. A. — A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. 103:250-252, 1960.
9. MAGALHÃES Fº, A. & COUTINHO-ABATH, E. — Splenic reactions in Swiss albino mice to single and multiple infections with *Schistosoma mansoni*. Am. J. trop. Med. & Hyg. 10:356-364, 1961.
10. MARSHALL, A. H. E. — An outline of the cytology and pathology of the reticular tissue. Edinburgh, Oliver & Boyd, 1956.
11. MARSHALL, J. D.; EVELAND, W. C. & SMITH, C. W. — Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. 98:898-900, 1958.
12. MEIRA, J. A. — Esquistossomiase mansoni hepato-esplênica. São Paulo, 1951. Tese. Fac. Med. Univ. São Paulo.
13. NOVIKOFF, A. B. — The biochemical cytology of the liver. Bull. New York Acad. Med. 35:67-70, 1959.
14. TEILUM, G. — Periodic acid-Schiff-positive reticulo-endothelial cells producing glycoprotein. Am. J. Pathol. 32:945-959, 1956.

Recebido para publicação em 9 maio 1962.