

ESTUDO IMUNOLÓGICO DO FÍGADO, BAÇO E GÂNGLIO LINFÁTICO DE PACIENTES NA FORMA HEPATOESPLÊNICA DA ESQUISSOMOSE MANSÔNICA, UTILIZANDO A MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A. Magalhães Filho *, Vital Lira ** e R. de Barros Coêlho ***

Os autores estudaram amostras de fígado, baço e linfonodos de 45 pacientes portadores da forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica, utilizando a técnica de imunofluorescência para detecção de antígenos em tecidos. Os casos que dispunham de dados clínicos e laboratoriais mais completos foram divididos em 3 grupos, de acordo com a idade, tendo sido tentada uma correlação entre a gravidade da doença e os achados imunológicos no baço e fígado. A correlação se mostrou positiva quanto ao baço e, sobretudo, nos grupos de crianças e adultos jovens. O estudo imunocitológico dos fígados à luz U.V. demonstrou a presença de células fagocitárias fluorescentes nos espaços porta, faixas de fibrose e, mais raramente nos sinusoides. A distribuição e frequência das células fluorescentes, excetuados os granulomas, mostrou-se irregular e in-característica. Estudo semelhante no baço demonstrou uniformidade de distribuição das células fluorescentes, predominantemente nos cordões de Billroth e nos sinusoides; menos frequentemente nas trabéculas. Os folículos linfóides aparecem desprovidos de células fluorescentes. Do exame de numerosos granulomas em fígado e linfonodos, foi realizado um estudo evolutivo desta lesão. Os diversos aspectos imunocitológicos permitiram estabelecer cinco fases neste processo. As células fluorescentes são fagocitárias e reconhecíveis como polimorfonucleares neutrófilos e histiócitos; células redondas pequenas e algumas células alongadas não puderam ser identificadas. O material fluorescente dentro do ovo ou no interior do citoplasma dos fagócitos aparece na forma de grumos e de finos grânulos com fluorescência verde-maçã brilhante.

Os principais aspectos defendidos pelos autores podem ser sumariados como segue: o baço é mais uniformemente representativo do estado imunológico vigente nesta doença; as lesões fibroplásticas do fígado guardam relação direta com reações imunológicas; o infiltrado inflamatório dos espaços porta e das faixas de fibrose é específico, pelo menos em parte; o granuloma esquistossomótico é um processo reacional específico frente ao material antigênico contido no ovo; o material antigênico demonstrado pelo método usado na esquistossomose mansônica é particulado (o método não permite demonstrar antígenos solúveis).

INTRODUÇÃO

Desde há algum tempo foram descritas alterações morfológicas desenvolvidas em animais experimentalmente infectados com schistosomas que, embora não fossem convenientemente interpretadas, representam, sem dúvida, manifestações de um mecanis-

mo imunoalérgico (9, 10, 13, 24, 31 e 32).

Posteriormente foi também observado que reinfecções podem desencadear exacerbação deste estado imunológico, determinando uma reação celular intensa contra o parasito e seus produtos (11, 15, 16, 17, 18, 20 e 23). No caso particular do *S. mansoni*, uma série de trabalhos parasito-

(*) Prof. Adjunto Cad. Anat. Fisiol. Patol., Fac. Medicina Univ. Federal Pernambuco.

(**) Pesquisador Cad. Anatomia Fisiol. Patol., Fac. Med. Univ. Federal Pernambuco.

(***) Prof. Catedrático, Anat. Fisiol. Patol., Fac. Med. Univ. Federal Pernambuco.

lógicos, sorológicos e bioquímicos também confirmaram que o mecanismo imunológico atua como elemento básico na patogênese da doença, seja demonstrando a existência de frações antigênicas no sôro de pacientes ou de animais infectados (6 e 27), seja de anticorpos específicos demonstráveis por técnicas de imunodifusão e outras (28 e 29), seja, finalmente, pela constatação de fenômenos premunitórios após a primo-infecção, como recentemente foi demonstrado por Sadun (26) e Smithers (30), em macacos.

Últimamente, técnicas imunocitoquímicas vieram confirmar, em nível tissular, a participação de reações antígeno-anticorpo em animais experimentalmente infectados (1 e 22).

O presente trabalho utiliza técnicas de imunofluorescência para a detecção de antígenos e as alterações por êles induzidas em fígado, baço e gânglio linfático de pacientes esquistossomóticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 45 casos de pacientes esquistossomóticos internados nos hospitais Universitário, Infantil Manoel de Almeida e Barão de Lucena, no Recife. Em todos os casos a doença se manifestava na forma hepatoesplênica e a colheita do material para estudo se fazia durante os diversos procedimentos cirúrgicos utilizados para o tratamento da hipertensão porta ou do hiperesplenismo. Além do estudo clínico e laboratorial a que eram submetidos nas enfermarias onde internados, selecionamos os doentes cujas intradermorreações (técnica de Pelegrino-Kagan (12) se mostravam intensas.

Dois casos foram tomados como testemunhas para contrôlo da especificidade das técnicas: um de anemia falciforme e, o outro, de hepatoesplenomegalia não esquistossomótica.

DETALHES TÉCNICOS

1. *Colheita e preparo das amostras de tecidos* — Biópsias de fígado, o baço e

eventualmente linfonodos eram retirados pelo cirurgião e imediatamente cortados em amostras de cêrca de 10 x 5 x 3 mm a fim de serem submetidas a congelamento instantâneo em um banho de gêlo-sêco-acetona, tendo o cuidado de evitar o contacto direto das amostras com a mistura congeladora, o que garante a integridade proteica dos tecidos, possibilitando seu posterior uso em técnicas de imunofluorescência. Amostras semelhantes eram fixadas em líquido de Carnoy para inclusão em parafina e estudo de suas secções pelas técnicas histológicas e histoquímicas usuais (H. E., tricrômicos e técnica de Unna-Papenheim).

2. *Corte dos tecidos* — As amostras para fins imunológicos eram cortadas em micrótomo criostático (modelo ITC) em seções de 4 μ montadas em lâminas, as quais, no momento do estudo, eram degeladas em câmara sêca por alguns minutos e transferidas para câmara úmida após serem cobertas com o sôro indicado pelo teste em realização (veja testes).

3. *Seleção e conjugação do anti-sôro específico* — Dos pacientes que apresentavam as mais intensas reações positivas pela técnica de Pelegrino-Kagan (12), era retirado sangue para a obtenção do anti-sôro. Parte dêste era mantido em natureza para utilização no teste indireto; parte, conjugado com isotiocianato de fluoresceína em celite, segundo a técnica de Coons, modificada * (8), para utilização nos testes direto e de inibição. Antes da utilização nos testes, o anti-sôro conjugado é adsorvido na presença de pó de tecido para dêle retirar o chamado "material fluorescente não conjugado" (UFM), porventura existente.

Após êstes procedimentos, uma amostra do anti-sôro conjugado é diluído em proporções crescentes em solução tamponada de fostato-difostato de sódio, pH 7.1 (1:2; 1:5; 1:10; 1:20) e testadas a sua especificidade e intensidade de fluorescência. A maior diluição eficiente — no nosso caso 1:10 — é tomada como base para a diluição do restante do anti-sôro conjugado que, então, distribuído em alíquotas de 2ml, é estocado em congelador (— 20°C).

(*) 2 ml de sôro são misturados em 2 ml de tampão carbonato-bicarbonato de sódio, pH 8.5. Agita-se por 5 minutos e adicionam-se 5-10 mg do fluorocromo (ITCF em celite). Novamente é agitada a mistura e, em seguida, centrifugada. O sobrenadante é deixado fluir sobre uma coluna de Sephadex G-25 para filtração e separação do conjugado. O preparo da coluna pode ser visto em Nair (Fluorescent Protein Tracing-Livingstone-Edinburgh & London, 1962).

4. *Anti-gama-globulina humana fluoresceïnizada* — Toma-se 1 ml da anti-gama-globulina humana fluoresceïnizada comercial — Wellcome Laboratories, London), — no nosso caso — e a êle se adicionam 11 ml do tampão fosfato-difosfato de sódio, pH 7.1 (PBS). Após mistura, adicionam-se 20 mg de pó de tecido e agita-se por 30 minutos; centrifuga-se a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante é dividido em alíquotas de 2 ml, que se prestam à utilização no teste indireto.

5. Testes

a) *Teste direto* — Os cortes de tecido são cobertos com o anti-sôro conjugado e deixados reagir por 30 minutos em câmara úmida. A seguir, são lavados com uma solução tamponada de fosfato-difosfato de sódio pH 7.1 (PBS), montadas com o mesmo tampão sob laminula e lacradas com esmalte de unhas.

b) *Teste indireto* — Os cortes são recobertos com anti-sôro não conjugado e deixados reagir por 30 minutos em câmara úmida; lavados com o PBS, pH 7.1 e novamente recobertos pela anti-gama-globulina humana fluoresceïnizada durante 30 minutos, em câmara úmida. O final do procedimentos é o mesmo da técnica direta.

c) *Teste de inibição* — A primeira etapa dêste teste é a mesma observada no teste indireto. Em seguida, à lavagem, com o tampão, os cortes são novamente expostos por 30 minutos ao anti-sôro conjugado, em câmara úmida, o final do processo sendo o mesmo já descrito.

6. *Exame das preparações* — Foi usado um fotomicroscópio Zeiss, com fonte Ultravioleta HBO 200. Como filtro primário foi utilizado o GB 12 e, como secundário, o amarelo 530. Usou-se o condensador mais simples e, entre êle e a lâmina, uma gôta de glicerina.

7. *Documentação* — Para fotografias em preto-branco usamos o Tri X Pan de 400 ASA (Kodak) e o CT 18 (Agfa), para as coloridas.

RESULTADOS

Dos 45 casos humanos de esquistossomose mansônica, foram estudados o fígado e o baço em 25; em um, além destes, linfonodos mesentéricos foram também examinados. Nos restantes, apenas o baço foi pos-

sível estudar. Embora todos tenham sido inicialmente estudados do ponto de vista da imunofluorescência tissular, 34 — por disporem de dados clínico-laboratoriais mais completos — foram selecionados, por idade, em 3 grupos nos quais se tentou uma correlação clínico-imunológica (Quadro I). Para tal fim, um critério arbitrário de gradação da gravidade clínica foi utilizado, tomando por base os seguintes dados: hepatoesplenomegalia, hemorragias digestivas, hipertensão porta, citopenia sanguínea e protidograma. Para a gradação do conjunto de dados imunológicos, no fígado, foram considerados os seguintes itens: frequência de fluorescência, presença de material fluorescente extracelular, células fluorescentes no espaço porta, no parênquima e nas faixas de fibrose; granulomas esquistosomóticos, com material fluorescente intraovular e nas células que os circundam. No baço, para o mesmo propósito, foram consideradas: frequência de fluorescência, presença de células fluorescentes na pólpa vermelha, nas trabéculas e na pólpa branca.

Numa visão mais detalhada do quadro verificam-se os seguintes resultados, com relação ao baço:

1. No grupo 1 (0-19 anos) — composto de 9 casos, em 6 dêles houve coincidência entre a intensidade dos achados imunocitológicos e a gravidade clínica do caso; em 2, houve predominância da gravidade clínica sobre os achados imunológicos; finalmente, em 1 caso ocorreu o inverso.
2. No grupo 2 (20-29 anos, 15 casos) — houve coincidência entre a gravidade clínica e a intensidade dos achados imunológicos em 6; dos restantes, em 5 predominou a intensidade clínica e, em 4, ocorreu o inverso.
3. No grupo 3 (30-39 anos, 9 casos), houve coincidência em apenas 2; dos 7 restantes, em 5 predominou a intensidade imunológica e, em 2, a clínica.

ESTUDO IMUNOCITOLÓGICO E HISTOLÓGICO DOS FÍGADOS — As preparações de fígado observadas à luz ultravioleta revelam a mais alta frequência de material fluorescente no citoplasma de células fagocitárias. Assim, o citoplasma dos polimorfonucleares neutrófi-

CORRELAÇÃO CLÍNICO-IMUNOLÓGICA

GRUPO I (0-19 anos)

GRUPO II (20-29 anos)

GRUPO III (30-39 anos)

N.º CASO	GRADUAÇÃO CLÍNICA		GRADUAÇÃO IMUNOLÓGICA		N.º CASO	GRADUAÇÃO CLÍNICA		GRADUAÇÃO IMUNOLÓGICA		N.º CASO	GRADUAÇÃO CLÍNICA		GRADUAÇÃO IMUNOLÓGICA	
	CLÍNICA	FIGADO	BACO	FIGADO		CLÍNICA	FIGADO	BACO	FIGADO		BACO	CLÍNICA	FIGADO	BACO
5	+	+	++	+	19	+++	++	?	++	41	+++	++	++	?
6	+	+	++	+	21	+++	++	++	+	50	+++	++	++	++
8	+	+	++	?	22	+	++	?	+++	51	++	+++	+++	+++
9	+	+	++	+	23	++	++	+++	++	54	++	?	++	++
13	+	+	+	+	27	+	+	++	+	55	+	?	++	++
15	+	+	++	?	29	++	++	0	+	56	+++	?	++	++
16	+	+	+	+	30	+++	+	?	+++	57	++	+	++	++
17	+	+	++	++	31	++	++	++	++	59	+	?	++	++
18	+	+	+++	0	32	+	+	0	+++	60	+	?	++	++
					33	++	++	++	+++	61	+	++	++	++
					35	+++	++	+++	++					
					36	+	+	+++	++					
					37	++	++	++	++					
					38	+++	+++	+	+++					
					40	+	+	0	+					

NOTA — O quadro I faz referência a números de casos aparentemente inexistentes. É que foram manipulados de fato 62 casos, todavia as preparações de 17 deles se viram danificadas durante a inundação de 1966.

los e histiócitos emitem luz verde-maçã brilhante, deixando transparecer a sombra nuclear, o que faz identificá-los facilmente. A fluorescência específica está distribuída nesses elementos celulares que infiltram os espaços porta, as faixas de fibrose e, mais raramente, nos sinusóides. Nos espaços porta ou nas faixas de fibrose, estas células fluorescentes se dispõem difusamente e/ou à maneira de granulomas. Estes, evidenciam sempre ovos ou os seus restos quitinosos, de acôrdo com o estágio evolutivo em que se encontram. O material fluorescente aparece dentro do ovo, em forma de grumos, e no citoplasma de células que se dispõem em coroa periovular. Outras vezes, quando o ovo está reduzido a uma casca contraída (autofluorescente), restam apenas raras células fluorescentes de localização periférica (Veja seqüência evolutiva do granuloma). Com relação às células que fluorescem difusamente nos espaços porta e faixas fibrosas, não há disposição ou características especiais. (Figs. 1 e 2). Apenas, variam sob o ponto de vista quantitativo de caso para caso, ou, às vezes, no mesmo fígado, em cortes diferentes. Contudo, nota-se que o infiltrado difuso das faixas fibrosas é quase exclusivamente formado por células mononucleadas, facilmente reconhecíveis pela sombra nuclear, embora nem sempre fôsse possível identificá-las. As células fluorescentes ocasionalmente vistas nos sinusóides, consideramos como células de Kupffer.

Os cortes histológicos dos fígados, estudados pelas técnicas usuais, mostram os aspectos já conhecidos, desde discretos infiltrados inflamatórios portais, com ou sem granulomas esquistosomóticos, até as faixas de fibrose portal características das formas avançadas da "fibrose hepática tipo Symmers". Todavia, o infiltrado celular dos espaços portais e faixas de fibrose, além dos elementos celulares observados através da luz ultravioleta (histiócitos e polimorfonucleares neutrófilos), apresenta ainda células linfóides, plasmócitos e outras células de origem discutida, semelhantes àquelas vistas nos cordões esplênicos e que, ao contrário dos linfócitos e plasmócitos, fluorescem com a técnica por nós empregada para detectar antígenos. Finalmente, comparando-se os achados histológicos e imunocitoquímicos, observa-se existência de correlação positiva entre a riqueza ce-

lular dos espaços e faixas de fibrose portais, vista sob microscopia de luz, e o número de células fluorescentes visualizadas através da luz ultravioleta.

ESTUDO IMUNOCITOLÓGICO E HISTOLÓGICO DOS BAÇOS — Do ponto de vista da disposição e características celulares, os baços se comportam ao exame sob microscopia de fluorescência de uma maneira mais ou menos uniforme. As células fluorescentes aparecem sempre na pólpa vermelha de maneira difusa e regular, de tal modo que qualquer campo examinado poderia ser considerado como representativo do conjunto. (Fig. 3) As células fluorescentes estão sempre dispostas na intimidade dos cordões de Billroth e, menos freqüentemente, no litoral dos sinusóides. (Fig. 4) Os elementos fluorescentes na pólpa vermelha são predominantemente de forma ovóide, entretanto células alongadas também são vistas, embora em menor número. A pólpa branca praticamente se apresenta desprovida de células fluorescentes (exceto em raros casos onde uma ou outra célula é vista sem localização regular), sendo facilmente identificada pelas áreas escuras que os folículos determinam nas preparações em contraste com as células fluorescentes da pólpa vermelha que delimita o folículo (Figs. 3 e 5) Ocasionalmente, células fluorescentes esparsas são vistas na intimidade das trabéculas. (Fig. 6)

Os cortes histológicos, examinados pelos métodos usuais, demonstram hiperplasia da pólpa vermelha, representada por hiperceularidade dos cordões e proliferação do endotélio sinusoidal. Estes achados, embora variem de intensidade, permitem separar dois tipos morfológicos: o primeiro, onde há intensa celularidade da pólpa vermelha, com ausência de fibrose, no qual nota-se proeminente proliferação endotelial. O outro, em que aparece fibrose intersticial, espessamento das trabéculas e da cápsula esplênica, associada à hiperceularidade dos cordões, porém com revestimento sinusoidal formado de células achatadas. Neste grupo, são freqüentes os nódulos fibrosideróticos. Em ambos os tipos, a hiperceularidade dos cordões de Billroth, embora predominantemente representada por células poliédricas, apresentava elementos celulares alongados.

ASPECTOS PARTICULARES DO MATERIAL E DAS CÉLULAS FLUORESCENTES

Sendo o objetivo fundamental desta experiência a detecção de antígeno nos tecidos, vale registrar a forma sob a qual êle se apresentou. No interior de ovos ainda íntegros, o material fluorescente se mostrou homogêneo. Quando, porém se dava a extrusão, o exame em maior aumento (500 a 1000x) demonstra a existência de finas partículas conglomeradas, livres ou no citoplasma das células. Esta característica morfológica é comum às células fluorescentes independentes de granuloma, no fígado e no baço.

Comparando os achados celulares observados à microscopia comum com os aspectos vistos através da imunofluorescência, é possível admitir que os elementos celulares poligonais fluorescentes correspondam a células histiocitárias; os polimorfonucleares neutrófilos, por outro lado, são facilmente reconhecíveis à luz ultravioleta. A identificação, contudo, dos elementos celulares alongados, que também se mostram fluorescentes, ocasionais no fígado e mais frequentes nos cordões esplênicos, não nos foi possível realizar.

SEQÜENCIA EVOLUTIVA DO GRANULOMA ESQUISTOSOMÓTICO À MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA — Do estudo de numerosos cortes de fígado e linfonodos onde reações granulomatosas ao ovo de S.M. apareciam sob variados aspectos, característicos de um processo dinâmico, é possível compor a seguinte seqüência evolutiva:

1) ovo íntegro, repleto de material fluorescente específico, na forma de massas ou grumos, sem fluorescência de células em tórno; (fig. 7).

2) ovo com casca rôta, extravasamento parcial do material fluorescente específico e presença de algumas células carregadas de material fluorescente na estreita vizinhança da casca (fig. 8);

3) ovo levemente contraído, esvaziado de material fluorescente específico e circundado de grande número de células fluorescentes (fig. 9);

4) ovo totalmente vazio, envolto por uma coroa de células fluorescentes, seguida de um halo onde as células fluorescentes são raras e mais periféricamente circundado por uma zona densamente povoa-

da de elementos fluorescentes (figs. 10 e 11).

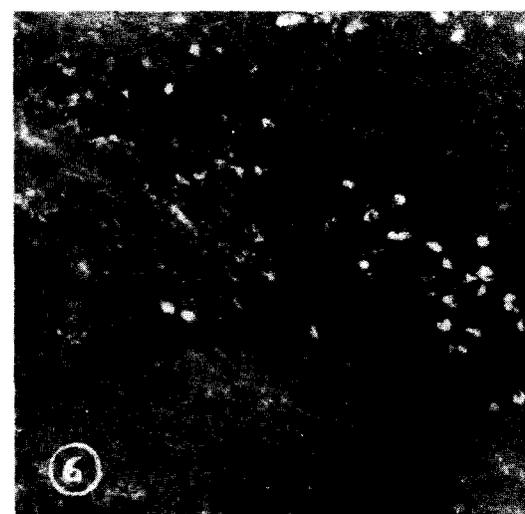
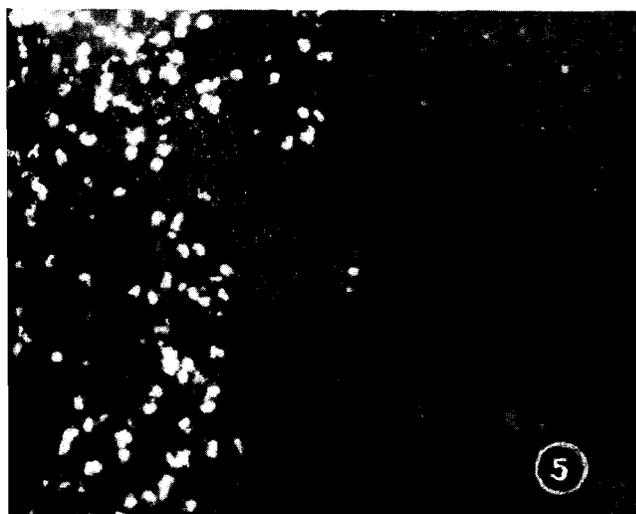
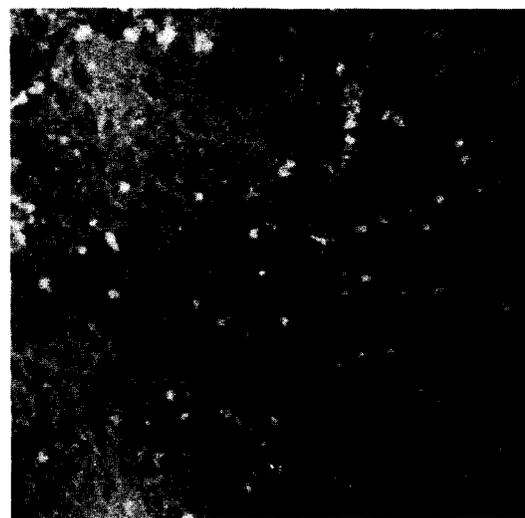
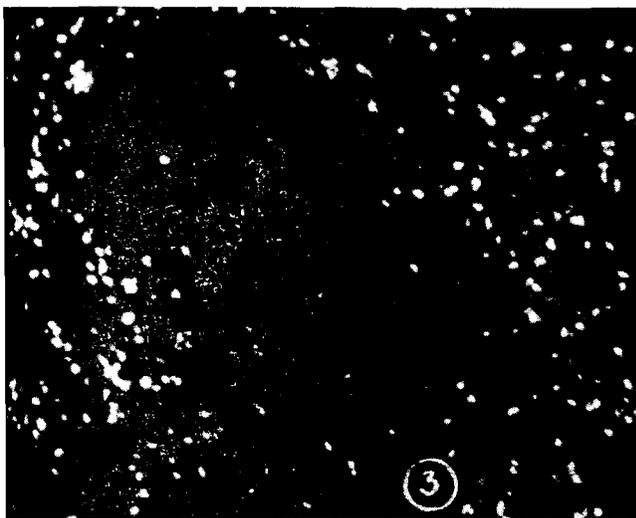
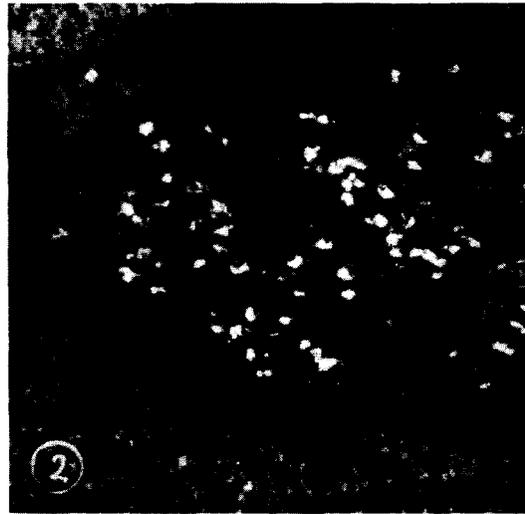
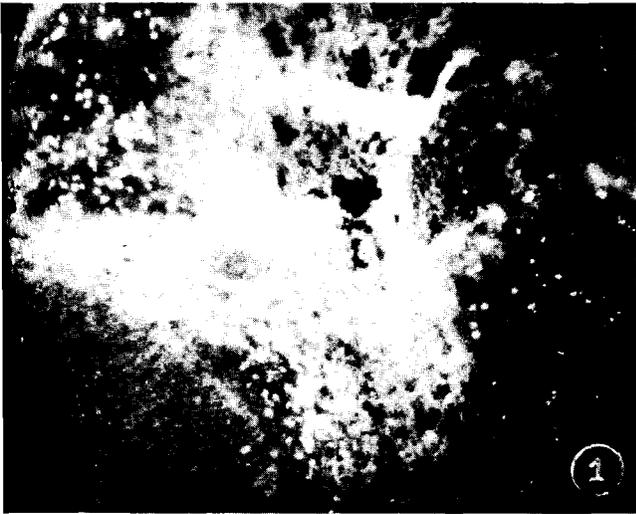
5) Casca de ovo totalmente vazia, desprovida de envoltório de células fluorescentes, notando-se raras células fluorescentes em disposição ainda circular, porém muito distante do ovo (fig. 12).

Apesar da intensa fagocitose, material fluorescente em grumos também é visto extracelularmente, mesmo nos estádios finais acima enumerados.

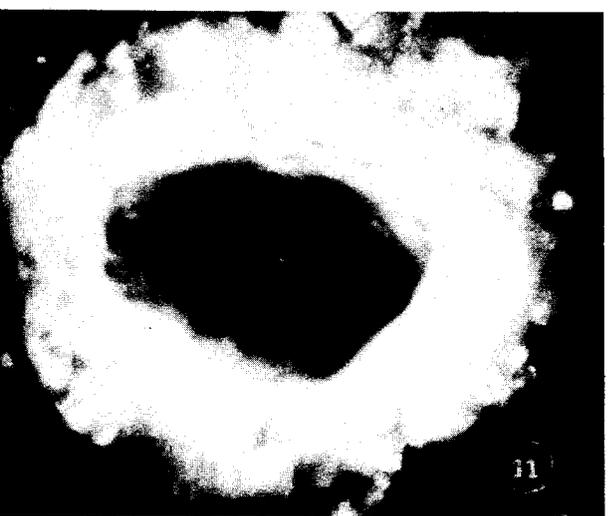
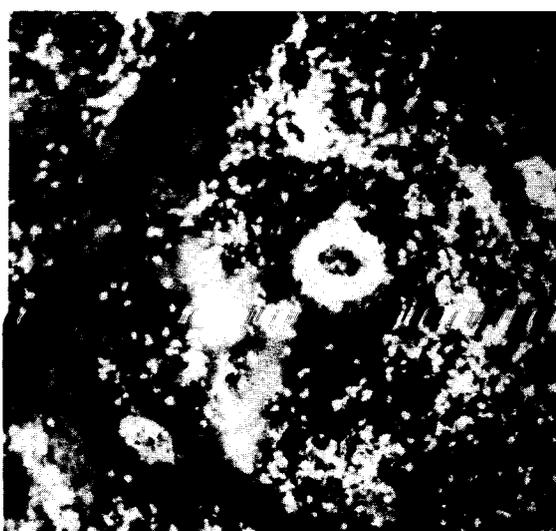
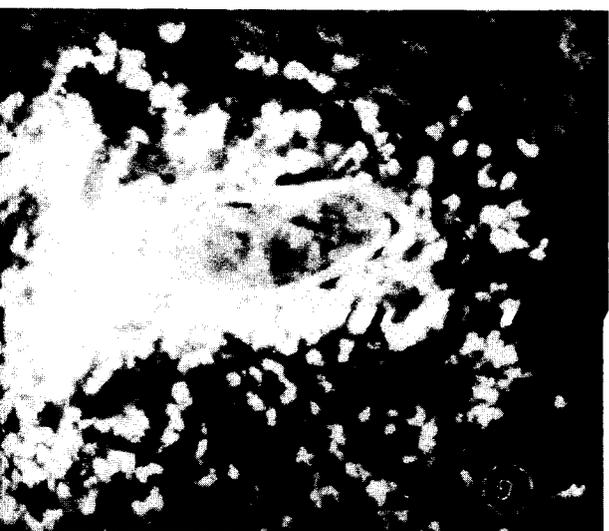
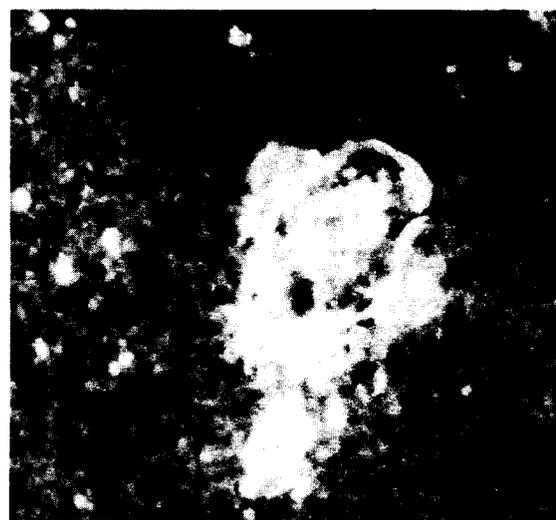
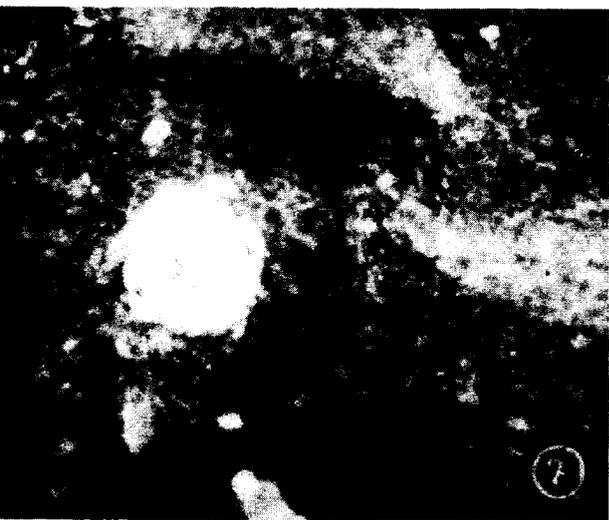
COMENTÁRIOS

Utilizamos deliberadamente as técnicas para detecção de antígeno em tecidos a partir do anti-soro de pacientes esquistosomóticos fluoresceinizado (teste direto) por ser reconhecidamente aquêle que permite fixar diretamente o anticorpo sobre o antígeno; ou do anti-soro não marcado (primeira fase do teste indireto) que funciona como peça intermediária específica entre o antígeno e a anti-gama-globulina fluoresceinizada. De modo diverso se têm comportado alguns autores (3) que usaram anti-gama-globulina antiespécie fluoresceinizada, aplicada diretamente sobre os tecidos. Tal procedimento condiciona apenas a visualização de gama-globulinas presentes no interior das células, que embora possam incluir anticorpos específicos da doença em causa, contém sem dúvida outros anticorpos.

1. CORRELAÇÃO CLÍNICO IMUNOLÓGICA — A tentativa de correlacionar a gravidade clínica da doença com os achados imunológicos merece algumas considerações gerais. Em primeiro lugar, a amostra é escassa, tendo em vista o grau de variação encontrado, especialmente nos aspectos imunológicos observados no fígado. Por outro lado, o conjunto de manifestações clínicas usualmente observado nestes pacientes traduz perturbações tão variadas que muitas vezes não podem ser relacionadas entre si e mais dificilmente ainda com aspectos de um fenômeno de natureza diversa, como o imunológico. Entretanto, o que nos levou a tentar uma análise dêste tipo foi o conhecimento adquirido, através de trabalhos experimentais prévios, de que sendo a Esquistossomose uma parasitose endógena, o produto dos parasitas e seus



- Fig. 1 — Fígado — Caso 44 — Células fluorescentes difusamente distribuídas em faixa de fibrose portal (aprox. 63 x).
- Fig. 2 — Fígado — Caso 30 — Células fluorescentes de distribuição irregular em placa de fibrose portal. Praticamente tôdas as células são mononucleadas (aprox. 160 x).
- Fig. 3 — Baço — Caso 29 — Células fluorescentes distribuídas na pólpa vermelha. A área escura corresponde a folículo linfóide. (Aprox. 63 x).
- Fig. 4 — Baço — Caso 38 — Detalhe da pólpa vermelha demonstrando células fluorescentes nos sinusóides (aprox. 160 x).
- Fig. 5 — Baço — Caso 44 — Detalhe demonstrando limite entre a pólpa vermelha (à esquerda) e a pólpa branca (à direita), notando-se ausência de fluorescência nesta última, exceto em uma célula provavelmente dentro da arteríola centro-folicular (aprox. 160 x).
- Fig. 6 — Baço — Caso 29 — Células fluorescentes na trabécula esplênica (Aprox. 160 x).



- Fig. 7 — Gânglio — Caso 31 — Ovo repleto de material fluorescente específico; ausência de células fluorescentes em tórno (Aprox. 160 x).
- Fig. 8 — Glânglio — Caso 31 — Ovo com casca rôtta com extravazamento parcial do material fluorescente específico; algumas células fluorescentes são vistas na vizinhança da casca (Aprox. 160 x).
- Fig. 9 — Fígado — Caso 31 — Ovo com casca vazia de material fluorescente; numerosas células fluorescentes circundam-no (Aprox. 160 x).
- Fig. 10 — Fígado — Caso 30 — Granuloma em completo desenvolvimento (Aprox. 63 x).
- Fig. 11 — Fígado — Caso 30 — Detalhe do centro de um granuloma, vendo-se ovo vazio, envólto por material fluorescente específico, livre e fagocitado (Aprox. 400 x).
- Fig. 12 — Fígado — Caso 30 — Granuloma em fase regressiva, mostrando autofluorescência da casca e ausência de células fluorescentes na sua vizinhança (Aprox. 160 x).

ovos representam um considerável acervo antigênico. Contudo como a nossa amostra representa a doença na sua forma hepatoesplênica, onde fenômenos de natureza circulatória participam da sua apresentação clínica, nosso objetivo foi o de verificar até que ponto a fenomenologia imunológica continuava a atuar.

Parece-nos lícito admitir ser o baço mais representativo das alterações imunológicas, sobretudo em crianças e indivíduos jovens (grupos I e II), o que seria compreensível tendo em vista ser este órgão receptor e tradutor das manifestações imunológicas. No fígado, ao contrário — um dos órgãos onde se assestam as alterações frente a vermes, ovos e seus produtos — o achado da fluorescência específica embora nos traga aspectos interessantes no que se refere aos granulomas e ao infiltrado difuso do espaço porta e das faixas de fibrose, se mostrou irregular em distribuição. Esta constatação demonstra a escassa probabilidade de que amostras, necessariamente colhidas ao acaso, venham a ser representativas para a avaliação da intensidade da doença. Por tais motivos, deixamos de avaliar os resultados concernentes aos aspectos imunológicos hepáticos.

Finalmente, poderíamos afirmar que o baço, particularmente sua pólpa vermelha, se comporta à luz ultravioleta como um espelho dos fenômenos imunológicos desencadeados pela circulação de antígenos nesta doença. Este aspecto se coaduna perfeitamente com as comprovações obtidas através de experimentação em animais. (2 e 21).

2. ASPECTOS IMUNOCITOLÓGICOS — Fígado — É conhecido o encontro tanto nos espaços porta como em faixas de fibrose, de células inflamatórias. Entretanto fazia-se necessário analisar a natureza específica ou não destes elementos celulares. Em nossas preparações examinadas sob luz ultravioleta, várias destas células aparecem fluorescentes, comprovando que mesmo na evolução de lesões fibroplásticas da hepatopatia crônica esquistosomótica, a participação do mecanismo imunológico continua a se fazer. Um outro aspecto digno de registro foi a observação de fragmentos, às vezes diminutos, de casca de ovos autofluorescentes, não visualizados nas preparações histológicas realizadas nos

mesmos cortes. Raramente foi encontrada a fluorescência em células sinusoidais, consideradas como de Kupffer. Atribuímos a raridade deste achado à possibilidade de bloqueio anterior destas células fagocitárias por pigmentos do parasito, como sugerido em trabalho experimental (22).

Recentemente, Andrade (4), tentando detectar anticorpo e não antígeno como no presente trabalho, em fígado de pacientes esquistosomóticos, descreve o achado, embora raro, de fluorescência específica em células "localizadas da mesma maneira que as células de Kupffer". Achemos estranha esta observação, bem como a interpretação do autor de que a célula de Kupffer se houvesse diferenciado em célula formadora de anticorpo.

Por outro lado, o encontro "de infiltração" portal difusa, mesmo nos casos avançados da esquistosomose hepatoesplênica, tem sido discutido por alguns autores (4 e 5), como indicativo de uma hepatite em evolução, não havendo acordo quanto à sua especificidade. Andrade (4), comentando o problema, admite como provável um mecanismo de hipersensibilidade retardada para explicá-lo. Acreditamos haver demonstrado, com os dados acima referidos, que a presença do "infiltrado" inflamatório difuso, não relacionado com granuloma e sistematicamente observado nos espaços porta e nas faixas de fibrose, traduz um grande contingente antigênico retido pelas células fagocitárias e que naturalmente garante a continuidade das reações específicas no nível destas estruturas. Não nos parece caber dúvida, portanto, de que na base dos fenômenos fibroplásticos portais e da chamada "hepatite crônica" se encontra a etiologia esquistosomótica representada pelas suas frações antigênicas.

Quando se olham as lesões portais em atividade, sobretudo através do ângulo histofuncional que nos favoreceram a histoquímica e a imunocitoquímica, percebe-se uma semelhança entre elas e a pólpa vermelha do baço, como se "micro-órgãos" retículo-endoteliais se houvessem desenvolvido nestas áreas.

Baço — A uniformidade de distribuição das células fluorescentes na pólpa vermelha do baço caracteriza mais uma vez o comportamento funcional deste órgão. A despeito de os cortes histológicos usuais

haverem demonstrado, como já era do conhecimento prévio: dois aspectos morfológicos (hipercelularidade da pólpa vermelha, hiperplasia endotelial e dos folículos; e em outro tipo, fibrose superposta aos aspectos anteriores), não houve diferença detectável na distribuição e localização das células fluorescentes entre êstes dois tipos.

A rara presença de elementos fluorescentes indicativos de antígeno nos folículos linfóides, como já referida em vários trabalhos experimentais (7, 14, 22 e 33) justifica-se pelo fato de a sua população ser constituída por células linfóides jovens, precursoras das formadoras de anticorpos e não fagocitárias. Muito ao contrário, na pólpa vermelha se situam, tanto no litoral como na intimidade dos cordões, numerosas células fagocitárias.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MATERIAL E AS CÉLULAS FLUORESCENTES — A forma sob a qual o material fluorescente foi visualizado leva-nos a admitir a natureza particulada do complexo antigênico observado. No entanto, êste fato não nos autoriza a afastar a possibilidade da existência de frações antigênicas solúveis, que a técnica utilizada não permite detectar.

Quanto às células fluorescentes, podemos afirmar serem fagocitárias. Polimorfonucleares neutrófilos e histiócitos foram perfeitamente reconhecidos, sobretudo nas lesões granulomatosas periovulares. Ao contrário, pequenas células redondas e células alongadas, estas últimas mais freqüentemente localizadas na pólpa vermelha do baço, não puderam ser classificadas. Esta dificuldade já havia sido encontrada por alguns autores. Assim White (33), usando teste direto para detecção de antígeno no baço de galinha, refere textualmente que "antigen was mainly detected in or on rather elongated spindle-shaped cells, which were distributed in the white pulp near the margin with the red pulp", omitindo a identidade dêstes elementos. Andrade & Andrade, (3) referiram-se a "cé-

lulas fusiformes comprimidas na pólpa esplênica... confundíveis com fibroblastos", às quais atribuem natureza reticular, baseados em método histoquímico.

4. CONSIDERAÇÕES SOBRE A SEQUÊNCIA EVOLUTIVA DO GRANULOMA ESQUISTOSOMÓTICO — O quadro geral das alterações imunológicas locais frente ao ôvo de *Schistosoma mansoni* se comporta de modo semelhante ao admitido para outros agentes parasitários endógenos. O ôvo não se limita a despertar simplesmente uma reação do tipo "corpo estranho", mas caracteriza um complexo reacional específico contra o material antigênico que contém. Como ficou demonstrado, após a rotura da casca e conseqüente extrusão dos produtos do miracídio, tem início uma reação fagocitária local, que se prolonga até o total esvaziamento da carga antigênica do ôvo. Quanto ao material fluorescente extracelular, presente por vezes na vizinhança do ôvo, admitimos resultar de insuficiente capacidade fagocitária. Talvez esta ocorrência seja a explicação para o fenômeno da "franja eosinofílica" descrita em outra parte (19). Em estágios posteriores, quando apenas restam os fragmentos da casca, as células fagocitárias fluorescentes são encontradas distantes do centro do granuloma, parecendo haver ocorrido uma migração ativa dêstes elementos celulares para os espaços porta e faixas de fibrose, no caso do fígado.

Experimentalmente, o granuloma esquistosomótico já havia sido estudado sob imuno fluorescência (1) e, embora não houvesse sido tentado um estudo da sua evolução, alguns dos aspectos descritos coincidem com os agora apresentados.

AGRADECIMENTO

Queremos registrar nossos agradecimentos aos Professores Amaury Coutinho e Hélio Coutinho; a Sônia Granja e à Kellogg Foundation de cuja colaboração e auxílio dependeu a realização do presente trabalho.

S U M M A R Y

Fluorescent antibody technics were used to determine the localization and distribution of schistosomal antigen in tissue cells, using surgical samples of liver, spleen and lymph nodes. Samples obtained from 45 patients during splenectomy were frozen in dry-ice-acetone bath and sections 4 μ thick were cut on a cryostat microtome. Similar sections were fixed for routine histological and histochemical study.

Serum samples were obtained from selected patients by skin test and conjugated with fluorescein isothiocyanate according to the modified method of Coons et al. For localizing the sites of antigen deposition in tissue cells, direct and indirect tests were performed using fluorescein attached to the antibody (from patients serum). Thus the sites of antigen-antibody combination could be identified by their apple-green bright fluorescence. For confirmation of specificity inhibition, tests with non-conjugated serum from the same patients were performed.

The presence of antigen on the spleen and their relative amount were arbitrarily graded according to the frequency of cells involved, so that an attempt was made to correlate the immunological finding with the clinical aspects of the patients. The patients were divided in 3 groups (0 to 19, 20 to 29 and 30 to 39 years of age) and were graded according to the severity of symptoms. A positive relationship was found in the first group (0-19 years) with a suggestive parallelism between the immunological and clinical aspects.

Pathological finds: — The spleen from patients of all three groups showed hyperplasia of lymphatic follicles with a large germinal center and hyperplasia of the red pulp; the sites of antigen deposition were found by the fluorescent-antibody technic in cells of the red pulp recognized as neutrophils and histiocytes, they were located in the sinusoids and Billroth cords and some in the trabeculae.

The cells of the lymphatic centers did not show fluorescence.

The pathological changes observed in the liver were characterized by inflammatory cells infiltrating the portal spaces and portal fibrosis characteristic as that described in Symmers "cirrhosis". They were located, immediately around the eggs, in several layers of histiocytes and neutrophils (some eosinophils), or a diffuse infiltration of those cells were present in portal spaces with or without fibrosis suggesting no relationship to the eggs.

The central area of the granuloma corresponding to the egg substance showed bright fluorescence, with the surrounding cells. When the egg was empty and the shell shrunked, the fluorescent material was found around the shell, and the number of fluorescent cells were more prominent in the granuloma.

The different aspects related to the antigenic material corresponding to the egg substance, which showed positive to fluorescent antibody and the presence of fluorescent cells around, permit to describe a pattern of the granuloma mechanism: 1 st) The egg is full of fluorescent material without fluorescent cells around; 2 nd) the egg shell shows disrapture and fluorescent material starts to come out; some fluorescent cells are found just about the shell; 3 rd) the egg shell is contracted and empty, fluorescent material can be found around 4th) the eggs shell is reduced to a shrunked line (non specific fluorescent) with and a large number of fluorescent cells surround the shell (full size granuloma); an area of non fluorescent cells, surrounded by a zone of fluorescent cells; 5th). Finally, the granuloma is reduced to a shrunked shell surrounded by a few fluorescent cells far from the center. Lymph nodes, as well as the spleen, did not show fluorescent cells in the lymphatic follicles but they were very large and quite a number of eggs were located in the reticular capillaries. The granulomatous reactions did not show differences from those described in the liver.

The authors suggest that the splenic changes, visualized by immunofluorescent technic were more uniform and can be representative to demonstrate the immunological stage of the disease. The liver, because of the location of eggs and worms, showed more reactive and variations could be found from one section to another.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDRADE, Z.; PARONETTO, F. & PCPPER, H. — Immunocytochemical studies in Schistosomiasis. *Am. J. Path.* 39: 589-598, 1961.
- 2 — ANDRADE, Z. — Aspectos experimentais da esplenomegalia da esquistosomose. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 4: 249-255, 1962.
- 3 — ANDRADE, Z. & ANDRADE, S.G. — Patologia do Baço na Esquistosomose hépatoesplênica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 218-227, 1965.
- 4 — ANDRADE, Z.A. — O Problema da hepatite crônica na Esquistosomose mansônica. *Jornal Brasileiro de Medicina Tropical*, 1: 19-26, 1967.
- 5 — BOGLIOLO, L. & NEVES, J. — Ocorrência de hepatite na forma aguda ou toxêmica da *E. mansônica*, antes da maturação dos vermes e da postura dos ovos, com algumas considerações sobre a forma aguda com toxemia da Esquistosomose. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais*. 22: 47-74, 1965, (Publicado em 1967).
- 6 — CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. & SILVA, L.C. da — A slide fluorescent antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnosis of Schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 327-331, 1965.
- 7 — CANNON, D.C. & WISSLER, R.W. — Spleen cell migration in the immune response of the rat. *Arch. Path.* 84: 109, 1967.
- 8 — COONS, A.H. and KAPLAN, M.H. — Localisation of antigen in tissue cells. II Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 9: 1-13, 1950.
- 9 — FAIRLEY, N.H.; MACKIE, F.P. & JASUDASAN, F. — Studies in Schistosoma spindale, Parts I-VI. *Indian M. Research Mem.* 17, 1930.
- 10 — FAUST, E.C. & MELENEY, H.E. — Studies on Schistosoma japonica. *Am. J. Hyg. Monag. Ser.*, 1924.
- 11 — KAGAN, I.G. & MERANZE, D.R. — The histopathology of immune and normal mouse skin exposed to cercariae of Schistosomatium Douthitti. *Jour. Inf. Dis.* 97: 187-193, 1955.
- 12 — KAGAN, I.G. & PELLEGRINO, J. — A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. *Bull. World Health Org.* 25: 611-674, 1961.
- 13 — KOPPISCH, E. — Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. IV. The pathological anatomy of experimental schistosomiasis mansoni in the rabbit and albino rat. *Puerto Rico J. Pub. Health & Trop. Med.* 13: 1-54, 1937.
- 14 — LA VIA, M.F.; DITCH, F.W.; GUNDERSON, C.H. & WISSLER, R.W. — The relations of antibody formation reticulo-endothelial structure and functions. In HELLER, J.H., ed. — Reticulo-endothelial structure and function. N. York, Ronald Press, 1960.
- 15 — LICHTEMBERG, F. von & RITCHIE, L.S. — Cellular resistance against schistosomula of Schistosoma mansoni in macaca mulatta monkeys following prolonged infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10: 859-869, 1961.
- 16 — LIN, S.S. & SADUN, F.H. — Studies on host-parasite relationships to Schistosoma japonicum. V — Reactions in skin, lungs and liver of normal and immune animal following infections with Schistosoma japonicum. *J. Parasitol.* 45: 549-559, 1959.
- 17 — MAGALHÃES F.º, A. & CCELHO, R. DE BARROS — Estudo histopatológico da penetração de cercarias de *S. mansoni* na pele de camundongos previamente infestados. *An Socied. de Biol. de Pe.* 15: 265-281, 1957.
- 18 — MAGALHÃES F.º, A. — Pulmonary lesions in mice experimentally infected with Schistosoma mansoni. *Am. J. Trop. Mep. Hyg.* 8: 527-535, 1959.
- 19 — MAGALHÃES F.º, A., COUTINHO-ABATH, E. & JAMPOLSKY, R. — Sobre a histopatologia e a histoquímica de prováveis reações de hipersensibilidade observadas na Esquistosomose mansônica. *Rev. Latinoamer. de Anat. Pat.* 4: 251-259, 1960.
- 20 — MAGALHÃES F.º, A. — Reações de hiper sensibilidade em *macacus Cebus sp.* infectados com Schistosoma mansoni. *Rev. Inst. trop. São Paulo* 3: 239-253, 1961.
- 21 — MAGALHÃES F.º, A.; COUTINHO-ABATH, E. — Splenic Reactions in multiple infections with Schistosoma Swiss albino mice to single and ma mansoni. *Am. Jour. trop. Med. Hyg* 10: 356-364, 1961.
- 22 — MAGALHÃES F.º, A.; IRIS, M.K. & MALEK, F.A. — Localization of antigen and presence of antibody in tissue of mice infected with Schistosoma mansoni, as indicated by fluorescent antibody technics. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 14: 84-89, 1965.
- 23 — MERANZE, D.R. — The histopathology of immune and normal mouse skin exposed to cercariae of Schistosomatium Douthitti (Trematoda:

- Schistosomatidae). Jour. Inf. Dis. 97: 187-193, 1955.
- 24 — NARABAYASHI, H. — Contribution to the study of Schistosomiasis japonica. Kyoto Igakai Zosshi (J. Kyoto Med. Assn.) 13 (n.º 2-3) 1916. Japanese text. *Apud* KAGAN, I.G.
- 25 — CLIVIER, L. & WEINSTEIN, P.P. — Experimental schistosome dermatitis in rabbits. J. Parasitol. 39: 1-12, 1953.
- 26 — SADUN, E.H.; BRUCE, J.I. & MACOMBER, P.B. — Parasitologic, pathologic and serologic reactions to *Schistosoma mansoni* in monkeys exposed to irradiated cercariae. Am. J. trop. Med. Hyg. 13: 548-557, 1964.
- 27 — SADUN, E.H.; SCHOENBECHLER, N.J. & BENTZ, M. — Multiple antibody response in *Schistosoma mansoni* infections: antigenic constituents in eggs, cercariae, and adults (excretions and secretions) determined by flocculation reactions, cross absorption and double diffusion studies. Am. J. trop. Med. Hyg. 14: 977-995, 1965.
- 28 — SILVA, L.C. & FERRI, R.G. — Immunodiffusion studies in human schistosomiasis mansoni. I. Hepato-intestinal and hepatoesplenic forms. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 7 1-6, 1965.
- 29 — SILVA, L.C. & FERRI, R.G. — Immunodiffusion studies in human schistosomiasis mansoni. II. Localization of antibodies by immunoelectrophoresis. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 7: 7-10, 1965.
- 30 — SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. — Naturally acquired resistance to experimental infection of *Schistosoma mansoni* in monkeys — (*macaca mulatta*) — Parasitology, 55: 701-710, 1965.
- 31 — SUEYASU, Y. — On the migratory course of *Schistosoma japonicum* in the body of the final host. Kyoto Igakai Zosshi. 17 (n.º 1), 1920. Japanese text with German abstract.
- 32 — WATARAI, J. — Studies on the skin reactions caused by *Schistosoma japonicum* cutaneously applied on the animals. Jap. J. Exper. Med. 14 (1-18), 1936.
- 33 — WHITE, R.G. — Functional recognition of immunologically competent cells by means of the fluorescent antibody technique. In Wolstenholme, G.E.W. & Knight, J., eds. — The immunologically competent cell: its nature and origin. London, J.E.A. Churchill, 1963. Ciba Foundation in Study Groys n.º 16.

I.º SIMPÓSIO FARMITALIA NO BRASIL

D A U N O M I C I N A

Enaltecendo o programa de comemoração do 20.º aniversário da QUÍMICA E FARMACÊUTICA PROQUIFAR S/A, representante e fabricante exclusiva no Brasil da Società Farmaceutici-Italia — FARMITALIA — de Milão, realizar-se-á no dia 5 de outubro de 1968, às 9 horas, no AUDITÓRIO FARMITALIA, a ser inaugurado na ocasião, nas modernas instalações da Proquifar, à Rodovia Washington Luiz, Km 5 — DUQUE DE CAXIAS — Estado do Rio de Janeiro, o

I.º SIMPÓSIO FARMITALIA NO BRASIL
SÔBRE A DAUNOMICINA

O novo antibiótico de atividade antileucêmica com a participação dos renomados cientistas:

Prof. Aurélio Di Marco — Itália
Dr. S. Holland — USA
Dra. Luisa Massimo — Itália
Dra. Charlotte Tan — USA
Dr. Moacyr Santos Silva — Brasil
Dr. Luiz Carlos Famadas — Brasil
Dr. Alfredo Pawlowsky — Argentina

REGULAMENTO DO PRÊMIO
GERHARD DOMAGK

Art. 1.º — O prêmio Gerhard Domagk é oferecido anualmente a partir de 1963, pela A CHIMICA "BAYER" S.A. em comemoração do centenário da fundação da FARBENFABRIKEN BAYER AG., de Leverkusen, Alemanha, ao autor ou autores do melhor trabalho sobre temas de medicina tropical (Doenças Infecciosas e Parasitárias, de Nutrição, Fisiologia e Higiene Tropicais), uma vez que o mesmo satisfaça às exigências deste Regulamento.

Art. 2.º — Concorrerão ao referido prêmio todos os trabalhos publicados na REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL durante o ano anterior.

Art. 3.º — O prêmio constará de uma importância em dinheiro, estipulada anualmente, e de uma medalha com o respectivo diploma assinado pelo Presidente e Secretário-Geral da Sociedade. No caso de trabalho em colaboração, o prêmio em dinheiro será conferido à equipe, porém, cada um dos co-autores receberá uma medalha e um diploma, que mencionará ser o prêmio pertencente à equipe.

Art. 4.º — Serão membros da Comissão Julgadora o Presidente da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, que a presidirá, e os integrantes do Conselho Consultivo da REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL.

Art. 5.º — Cada membro da Comissão Julgadora indicará os 5 melhores trabalhos publicados durante o ano, sendo premiado aquele que obtiver maior número. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical a decisão final em caso de empate.

Art. 6.º — A Comissão Julgadora deverá emitir seu parecer até a data do início do Congresso anual da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, quando o prêmio será entregue em sessão solene.

Art. 7.º — Não caberá qualquer recurso ao parecer da Comissão Julgadora.

Art. 8.º — O Presidente da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical será árbitro supremo para decidir as dúvidas surgidas na interpretação deste Regulamento ou resolver qualquer dificuldade em sua execução.