

Luís Carlos Leitão Adeodato

**Subpopulações de Linfócitos CD4, CD8 e CD45RB
em Enxertos Esplênicos Autólogos Heterotópicos
de Camundongos Sadios e Esquistossomóticos**

**Estudo Comparativo com o Baço Intacto
e o Remanescente Esplênico Vascularizado**

**Recife
Janeiro
2004**

Luís Carlos Leitão Adeodato

**Subpopulações de Linfócitos CD4, CD8 e CD45RB
em Enxertos Esplênicos Autólogos Heterotópicos
de Camundongos Sadios e Esquistossomóticos**

**Estudo Comparativo com o Baço Intacto
e o Remanescente Esplênico Vascularizado**

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE para obtenção do Título de Doutor

Orientador:

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Recife

Janeiro

2004

Adeodato, Luís Carlos Leitão

Subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB em enxertos esplênicos autólogos heterotópicos de camundongos saudáveis e esquistossomóticos : estudo comparativo com o baço intacto e o remanescente esplênico vascularizado / Luís Carlos Leitão Adeodato. – Recife : O Autor, 2004.

xx, 98 folhas : il., fig., tab., gráf.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2004.

Inclui bibliografia.

1. Cirurgia experimental – Baço – Imunologia. 2. Esquistossomose mansônica – Camundongos – Auto-implante esplênico. 3. Baço – Cirurgia – Auto-implantes. 4. Linfócitos (CD4, CD8 e CD45RB) – Subpopulações - Baço – Enxertos. 5. Citometria de fluxo – Enxertos esplênicos – Linfócitos. I. Título.

**617.551-089 CDU (2.ed.)
617.551 CDD (21.ed.)**

**UFPE
BC2004-374**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Relatório da Defesa Direta de Tese do Dr. Luiz Carlos Leitão Adeodato, de acordo com art. 5º da Res. nº. 01, de 03/04/2001, do CNE adotado pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental.

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e um de julho do ano dois mil e quatro, no Auditório Murilo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa direta de tese do Dr. Luiz Carlos Leitão Adeodato, para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. Cláudio Moura Lacerda de Melo, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE (Presidente da Banca Examinadora); Dr. Salvador Vilar Câmara Lima, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Renato Dornelas Câmara Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Edmundo Pessoa Almeida Lopes, Doutor do Departamento de Medicina Interna do CCS/UFPE; e, Leila Maria Moreira Beltrão Pereira, Doutora do Departamento de Gastroenterologia da UPE; e, para suplentes: interno, Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE, e, finalmente, externo, Dr. José Luiz de Lima Filho, Doutor do Departamento de Bioquímica e Biofísica da UFPE, tendo, como orientador, o Dr. Edmundo Machado Ferraz, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A tese apresentada pelo Dr. Luiz Carlos Leitão Adeodato versou sobre: “Subpopulações de Linfócitos CD4, CD8 e CD45RB em Enxertos Esplênicos Autólogos Heterotópicos de Camundongos Sadios e Esquistossomóticos: Estudo Comparativo com o Baço Intacto e o Remanescente Esplênico Vascularizado”. Após, a explanação de 30(trinta) minutos, pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com datashow, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. Cláudio Moura Lacerda de Melo (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima, Prof. Dr. Renato Dornelas Câmara Neto, Prof. Dr. Edmundo Pessoa Almeida Lopes, e Prof.ª Dr.ª Leila Maria Moreira Beltrão Pereira, todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. Cláudio Moura Lacerda de Melo (Presidente da Banca Examinadora), menção “Aprovado”, Prof. Dr. Salvador Vilar Câmara Lima, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Renato Dornelas Câmara Neto, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Edmundo Pessoa Almeida Lopes, menção “Aprovado” e Prof.ª Dr.ª Leila Maria Moreira Beltrão Pereira, menção “Aprovado”. Conclusão, o candidato, foi aprovado com menção “Aprovado”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos do que, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Niége Maria de Paiva Melo, Secretária, assinados depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 21 de julho de 2004.

Prof. Renato Dornelas Câmara Neto
Prof. Salvador Vilar Câmara Lima
Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo
Prof. Edmundo Pessoa Almeida Lopes
Prof.ª Leila Maria Moreira Beltrão Pereira
Niége Maria de Paiva Melo (secretária)

[Handwritten signatures and initials over the list of names]

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

PROF. AMARO HENRIQUE PESSOA LINS

VICE-REITOR

PROF. GERALDO MARQUES PEREIRA

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROF. CELSO PINTO DE MELO

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR**

PROF. GILSON EDMAR GONÇALVES E SILVA

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETOR SUPERINTENDENTE**

PROF. HELOÍSA MENDONÇA DE MORAIS

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

PROF. SÍLVIO ROMERO MARQUES

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

COORDENADOR

PROF. CARLOS TEIXEIRA BRANDT

VICE-COORDENADOR

PROF. SILVIO CALDAS NETO

CORPO DOCENTE

PROF. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ
PROF. ANTONIO ROBERTO DE BARROS COELHO
PROF. CARLOS AUGUSTO MATHIAS
PROF. CARLOS ROBERTO RIBEIRO DE MORAES
PROF. CARLOS TEIXEIRA BRANDT
PROF. CLÁUDIO MOURA LACERDA DE MELO
PROF. EDMUNDO MACHADO FERRAZ
PROF. FREDERICO TEIXEIRA BRANDT
PROF. JAIR DE ANDRADE LIMA
PROF. JOAQUIM ALVES NORÕES
PROF. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR
PROF. MARCELO SILVEIRA
PROF. NELSON COSTA REGO CALDAS
PROF. OYAMA ARRUDA FREI CANECA
PROF. RENATO DORNELAS CÂMARA NETO
PROF. RICARDO JOSÉ CALDAS MACHADO
PROF. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA
PROF. SAULO MONTEIRO DOS SANTOS
PROF. SÍLVIO ROMERO DE BARROS MARQUES
Prof. Tércio Souto Bacelar

Aos meus pais,
João e Lígia,
pela possibilidade de existir;
e poder aprender que
a Vida é árdua, porém bela

Aos meus irmãos,
João Maurício e Paulo Jorge,
pelo incessante questionamento
do método, da razão e da verdade

À minha irmã **Maria Carolina**
e às minhas tias **Irene e Nila** (*in memoriam*),
pela simplicidade, pureza e fé
no convívio
que me tornou sensível

Às minhas filhas
Renata, Roberta e Irene,
e ao meu filho **João,**
pela alegria,
pelo orgulho de ser pai,
e pela releitura da Vida

A **Danielle,** minha mulher,
pelo amor, meiguice, paciência,
e a companhia de todas as horas
que fazem os meus dias melhores

*"Nature had provided, in the white corpuscles as you call them...
in the phagocytes as we call them...
a natural means of devouring and destroying all disease germs.
There is at bottom only one genuinely scientific treatment for all diseases,
and that is to stimulate the phagocytes.
Drugs are a delusion."*

The Doctor's Dilemma
George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

A pessoas:

de Belo Horizonte, Minas Gerais

Ao **Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho**, misto de orientador, base logística e amigo-conselheiro em todos os momentos de dificuldades existentes nas fases de concepção, elaboração e execução do projeto de experimentação animal, pelo extremado rigor científico; pela simplicidade e naturalidade, pela capacidade inventiva e investigativa na solução dos incontáveis problemas enfrentados, trazendo tranquilidade à discussão científica e a infraestrutura de organização pessoal e material necessárias ao desenvolvimento deste estudo.

Ao **Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo**, que teve a paciência de me aturar, domesticar, questionar, orientar, e discutir a base metodológica do projeto, além de permitir a plena utilização de recursos do Laboratório de Cirurgia Experimental do HC-UFMG, com as oportunas sugestões imprescindíveis à execução de um trabalho consciente, criterioso e dedicado. Sua experiência, honestidade e tirocínio científicos, na rotina diária de um ambiente de pesquisa, transformaram o enfrentamento do desafio para a confecção e defesa de uma tese em sentimentos de responsabilidade, admiração e afeto, resultando na transparência deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira**, por possibilitar a utilização do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa Reneé Rachou - FIOCRUZ - MG, concedendo os princípios, meios e fins para a realização do estudo de citometria de fluxo.

À **Prof^a. Dra. Andréa Teixeira**, pela paciência, disponibilidade de tempo, fidelidade científica e simpatia constantes no exaustivo trabalho de captação dos baços, remanescentes e enxertos esplênicos, separação de células, marcação de linfócitos, leitura e interpretação dos resultados observados no citômetro de fluxo.

Ao **Sr. Alberto dos Santos**, responsável técnico pelo Biotério do GIDE, pela supervisão dos demais funcionários da casa na dedicação ao trabalho e cuidado diuturno aos animais; sempre solícito, com sua maneira introspectiva e ao mesmo tempo alegre de nos ajudar em todo o período.

À **Profª. Dra. Rosângela Teixeira**, cujo trabalho sobre esquistossomose e indução de abscessos hepáticos pela inoculação de *Staphylococcus aureus* nos serviu de fonte de inspiração para a elaboração do projeto inicial de tese, tendo sido o elo fundamental de ligação neste estudo envolvendo diferentes instituições de pesquisa.

Aos demais **funcionários e pesquisadores** dos diferentes centros com os quais convivemos em BH/MG, minha terra natal, pelo estímulo concedido de modo natural e despojado, apenas pelo compromisso de si mesmos para com a execução de um dia a dia de trabalho competente e profícuo, mantendo sempre acesa a chama da vontade de batalhar para a concretização deste estudo.

Aos grandes amigos **Lucinha e Oriane**, e **Vanessa e Marcelo**, pela imprescindível, gratuita, calorosa, suprida e reconfortante hospedagem que nos trouxe a providência, a saciedade e o repouso acalentadores ao final de cada um de tantos dias de labuta. E, especialmente, pelas inesquecíveis horas de discussão de projetos sobre a vida, nos quais suamos e sorvemos as gotas do respeito e admiração mútuos que nos aproximam, razões mais do que suficientes para a consolidação de uma grande amizade.

do Recife, Pernambuco

Ao **Professor Salomão Kelner** (*in memoriam*), destacado pesquisador na Área da Cirurgia e criador deste Curso de Pós-Graduação, ambiente que tornou possível a muitos de nós, cirurgiões, começarmos a perceber a importância da pesquisa científica no exercício diário da vida profissional. Esta homenagem é extensiva aos demais professores do antigo Hospital Pedro II, no Bairro dos Coelhos, também seus colegas e discípulos, com os quais tive a oportunidade de conviver e aprender.

Ao **Prof. Dr. Edmundo Machado Ferraz**, orientador da minha dissertação de mestrado e agora desta tese, que há muito me acolheu no seu time no meu retorno ao Recife, ao final da Residência Médica; por ter acreditado na minha força de trabalho, o que me possibilitou adquirir o conhecimento para praticar a cirurgia com sensatez e dignidade, e conquistar com orgulho a atividade de professor que exerço.

Ao **Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt**, ex-coordenador do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da UFPE, pela atenção, estímulos e cobranças durante a realização deste estudo.

À **Dra. Danielle Nebl Lacerda** pelo apoio e participação nas etapas mais importantes de execução deste trabalho, e pela orientação na análise criteriosa dos cortes histológicos dos fígados e do tecido esplênico dos camundongos.

Ao **Prof. Dr. Djalma Agripino de Melo Filho**, pela inestimável colaboração na análise estatística dos dados, facilitando de maneira simples e objetiva a compreensão e interpretação dos resultados observados.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Lacerda** e ao **Prof. Dr. Lamartine Aguiar** pelas construtivas críticas.

À **Profª. Lígia Leitão Adeodato**, pela revisão ortográfica.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Felipe Lins** e à **Profª Renata Adeodato**, pelas sugestões no "abstract".

Ao **Prof. Dr. Emanuel Dias**, reitor; ao **Prof. Dr. Guido Corrêa de Araújo**, pró-reitor; aos colegas da **Disciplina de Técnica Cirúrgica** e demais professores do **Departamento de Cirurgia**; aos amigos do **Serviço de Transplante Hepático do HUOC**; obrigado a todos da **UPE** pelo incentivo e apoio concedidos durante as minhas viagens a BH/MG, e pela reprodução e encadernação da parte gráfica do texto.

Aos amigos **Prof. Dr. Cláudio Amaro Gomes** e **Prof. Dr. Alex Caetano de Barros** pelo incentivo, e pela agradável e divertida companhia durante a realização do Curso de Doutorado e, em especial, aos amigos **Profª. Dra. Fernanda Fernández** e **Prof. Dr. João Evangelhista**, colegas do mesmo Curso, que, ao defenderem recentemente suas teses, me fizeram afiar a garra final, necessária para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos **Teresa Santiago** e **Antônio Fernando Pires**, pela gentil colaboração na confecção da parte gráfica das figuras da microscopia óptica e da citometria de fluxo do material em estudo. Ao amigo **Guilherme Carvalho Leite**, pela prestimosa ajuda na formatação e impressão da matriz gráfica do texto.

Aos amigos **Tarcísio Reis** e **Ana Isabel Sartori**, pela oportuna discussão sobre aspectos do modelo experimental. À amiga **Raquel Kelner Silveira**, pela prestatividade e incentivo.

Aos amigos **Cristina Mota, Fernando Spencer, Filipe Lima e Josemberg Campos**, pelo suporte aos plantões dos quais fui obrigado a me ausentar durante o trabalho de experimentação em BH/MG.

A **Márcia & Mércia**, pelo apoio, sempre duplamente alegre e sorridente na revisão normativa e elaboração da apresentação informatizada do estudo. À **Sra. Nieje Melo**, na ajuda do cumprimento das obrigações formais para a defesa desta tese.

A instituições:

À **UFMG**

À **FAPEMIG**, BH/MG

Ao **Instituto René Rachou**, FIOCRUZ, BH/MG

À **UFPE**

À **UPE**

Ao **Anatômica**, Recife/PE

Ao **Instituto Ageu Magalhães**, FIOCRUZ, Recife/PE

Ao **LIKA**, Recife/PE

minha sincera gratidão a todos vocês.

.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Lista de Abreviaturas.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Gráficos.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - MATERIAL E MÉTODO.....	09
2.1 - Infecção Esquistossomótica.....	10
2.2 - Desenho do Estudo.....	10
2.2.1 - Grupo A - Controle - Animais Sadios.....	10
2.2.2 - Grupo B - de Estudo - Animais Esquistossomóticos.....	10
2.3 - Baço Intacto.....	11
2.4 - Anestesia dos Animais.....	11
2.5 - Operações.....	11
2.5.1 - Esplenectomia Subtotal - Remanescente Esplênico Vascularizado.....	12
2.5.2 - Enxerto Total de Baço.....	12
2.6 - Cuidados e Evolução Pós-Operatórios.....	13
2.7 - Redesenho do Estudo após as Operações.....	13
2.7.1 - Grupo A - Controle - Animais Sadios.....	13
2.7.2 - Grupo B - de Estudo - Animais Esquistossomóticos.....	13
2.8 - Sacrifício dos Animais e Macroscopia.....	14
2.9 - Microscopia.....	14
2.9.1 - do Fígado.....	14
2.9.2 - do Tecido Esplênico.....	15
2.10 - Citometria de Fluxo no Tecido Esplênico – Etapas.....	15
2.10.1 - Separação de Células Mononucleares.....	15
2.10.2 - Imunofenotipagem dos Linfócitos.....	16
2.10.3 - Leitura e Registro Gráfico.....	17
2.11 - Análise Estatística.....	17

3 - RESULTADOS.....	19
3.1 - Mortalidade.....	20
3.2 - Peso dos Animais.....	20
3.3 - Patologia.....	20
3.3.1 - Macroscopia.....	20
3.3.2 - Microscopia.....	22
3.3.2.1 - <i>do Fígado</i>	22
3.3.2.2 - <i>do Tecido Esplênico</i>	22
3.4 - Citometria de Fluxo.....	23
 4 - DISCUSSÃO.....	 44
4.1 - Sobre o Objetivo do Estudo.....	45
4.2 - Sobre o Modelo Animal.....	49
4.3 - Definição de Termos e Aspectos Histológicos.....	52
4.4 - Mensuração da Função no Enxerto Esplênico.....	58
4.5 - Subpopulações de Linfócitos e Citometria de Fluxo.....	65
4.6 - Considerações Finais.....	70
 5 - CONCLUSÃO	 76
 6 - REFERÊNCIAS.....	 78

Lista de Abreviaturas

células NK - células matadoras naturais (ou *natural killers*)
CD - *Cluster of differentiation* (agrupamento de diferenciação ou epítopo)
CD4 - linfócito T auxiliar (ou *helper*)
CD8 - linfócito T citotóxico ou citolítico (ou *cytotoxic*)
CD45RB - linfócito T de memória
° C - graus Celsius
BH/MG - Belo Horizonte - Minas Gerais
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
FAPEMIG - Fundação de Assistência à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
Gate - portão, portal, cancela; agrupamento de células (*citometria de fluxo*)
g - grama
GIDE - Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose da UFMG
HC - Hospital das Clínicas; HUOC - Hospital Universitário Oswaldo Cruz
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
Ig - imunoglobulina
LIKA - Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami
mg - miligrama
ml - mililitro
μ - micra
μl - microlitro
mm - milímetro
mm² - milímetro quadrado
mm³ - milímetro cúbico
nº - número
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PE - Pernambuco
® - marca registrada
RPMI 1640 - meio de cultura de células (*Roswell Park Memorial Institute*)
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
UPE - Universidade de Pernambuco
x - vezes (multiplicado por)

Lista de Tabelas

		página
Tabela 1	Peso dos camundongos por grupo.....	20
Tabela 2	Média e desvio-padrão de CD4 nos grupos de camundongos sadios.....	23
Tabela 3	Média e desvio-padrão de CD4 nos grupos de camundongos esquistossomóticos.....	24
Tabela 4	Média e desvio-padrão de CD4 nos grupos de camundongos sadios e esquistossomóticos.....	24
Tabela 5	Média e desvio-padrão de CD8 nos grupos de camundongos sadios.....	25
Tabela 6	Média e desvio-padrão de CD8 nos grupos de camundongos esquistossomóticos.....	25
Tabela 7	Média e desvio-padrão de CD8 nos grupos de camundongos sadios e esquistossomóticos.....	26
Tabela 8	Média e desvio-padrão de CD45RB nos grupos de camundongos sadios.....	26
Tabela 9	Média e desvio-padrão de CD45RB nos grupos de camundongos esquistossomóticos.....	27
Tabela 10	Média e desvio-padrão de CD45RB nos grupos de camundongos sadios e esquistossomóticos.....	27
Tabela 11	Regressão linear múltipla para a associação entre as variáveis independentes e cada uma das variáveis dependentes.....	28

Lista de Figuras

		página
Figura 1	Histologia normal do fígado de camundongo sadio.....	29
Figura 2	Histologia do fígado de camundongo esquistossomótico.	29
Figura 3	Histologia normal do baço intacto de camundongo sadio.	29
Figura 4	Histologia do baço intacto de camundongo esquistossomótico	29
Figura 5	Histologia do remanescente esplênico vascularizado de camundongo sadio.....	30
Figura 6	Histologia do remanescente esplênico vascularizado de camundongo esquistossomótico.....	30
Figura 7	Histologia de enxerto do baço de camundongo sadio....	30
Figura 8	Histologia de enxerto do baço de camundongo esquistossomótico.....	30
Figura 9	Histologia de folículo linfóide do baço intacto de camundongo sadio.....	31
Figura 10	Histologia de folículo linfóide do baço intacto de camundongo esquistossomótico.....	31
Figura 11	Histologia de folículo linfóide de enxerto do baço de camundongo sadio.....	31
Figura 12	Histologia de folículo linfóide de enxerto do baço de camundongo esquistossomótico.....	31

Lista de Gráficos

		página
Grupo A1	Citometria de fluxo do baço intacto de camundongo sadio	
Gráfico 1	Gate controle de células mononucleares.....	32
Gráfico 2	População controle-negativo de linfócitos.....	32
Gráfico 3	Gate controle de linfócitos CD4.....	32
Gráfico 4	População de linfócitos CD4.....	32
Gráfico 5	Gate controle de linfócitos CD8.....	33
Gráfico 6	População de linfócitos CD8.....	33
Gráfico 7	Gate controle de linfócitos CD45RB.....	33
Gráfico 8	População de linfócitos CD45RB.....	33
Grupo A2	Citometria de fluxo do remanescente esplênico vascularizado de camundongo sadio	
Gráfico 9	Gate controle de células mononucleares.....	34
Gráfico 10	População controle-negativo de linfócitos.....	34
Gráfico 11	Gate controle de linfócitos CD4.....	34
Gráfico 12	População de linfócitos CD4.....	34
Gráfico 13	Gate controle de linfócitos CD8.....	35
Gráfico 14	População de linfócitos CD8.....	35
Gráfico 15	Gate controle de linfócitos CD45RB.....	35
Gráfico 16	População de linfócitos CD45RB.....	35
Grupo A3	Citometria de fluxo de enxerto do baço de camundongo sadio	
Gráfico 17	Gate controle de células mononucleares.....	36
Gráfico 18	População controle-negativo de linfócitos.....	36
Gráfico 19	Gate controle de linfócitos CD4.....	36
Gráfico 20	População de linfócitos CD4.....	36
Gráfico 21	Gate controle de linfócitos CD8.....	37
Gráfico 22	População de linfócitos CD8.....	37
Gráfico 23	Gate controle de linfócitos CD45RB.....	37
Gráfico 24	População de linfócitos CD45RB.....	37

Grupo B1 Citometria de fluxo do baço intacto de camundongo esquistossomótico

Gráfico 25	Gate controle de células mononucleares.....	38
Gráfico 26	População controle-negativo de linfócitos.....	38
Gráfico 27	Gate controle de linfócitos CD4.....	38
Gráfico 28	População de linfócitos CD4.....	38
Gráfico 29	Gate controle de linfócitos CD8.....	39
Gráfico 30	População de linfócitos CD8.....	39
Gráfico 31	Gate controle de linfócitos CD45RB.....	39
Gráfico 32	População de linfócitos CD45RB.....	39

Grupo B2 Citometria de fluxo do remanescente esplênico vascularizado de camundongo esquistossomótico

Gráfico 33	Gate controle de células mononucleares.....	40
Gráfico 34	População controle-negativo de linfócitos.....	40
Gráfico 35	Gate controle de linfócitos CD4.....	40
Gráfico 36	População de linfócitos CD4.....	40
Gráfico 37	Gate controle de linfócitos CD8.....	41
Gráfico 38	População de linfócitos CD8.....	41
Gráfico 39	Gate controle de linfócitos CD45RB.....	41
Gráfico 40	População de linfócitos CD45RB.....	41

Grupo B3 Citometria de fluxo de enxerto do baço de camundongo esquistossomótico

Gráfico 41	Gate controle de células mononucleares.....	42
Gráfico 42	População controle-negativo de linfócitos.....	42
Gráfico 43	Gate controle de linfócitos CD4.....	42
Gráfico 44	População de linfócitos CD4.....	42
Gráfico 45	Gate controle de linfócitos CD8.....	43
Gráfico 46	População de linfócitos CD8.....	43
Gráfico 47	Gate controle de linfócitos CD45RB.....	43
Gráfico 48	População de linfócitos CD45RB.....	43

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença infecciosa, causada por um verme (*Schistosoma mansoni*) que no seu ciclo evolutivo pode ter o homem como um dos seus hospedeiros definitivos. Nas formas mais avançadas, a embolização maciça de ovos depositados por vermes adultos no sistema da veia porta para o parênquima hepático provoca alterações inflamatórias na estrutura do fígado, modificando a arquitetura do órgão e induzindo à formação de granulomas, cuja resolução causa a fibrose de Symmers, característica histológica da fase crônica da doença. A fibrose determina resistência à passagem do fluxo sanguíneo da veia porta pelo fígado, causando hipertensão no território das veias do esôfago terminal e fundo gástrico, onde são formadas varizes, cuja ruptura causa episódios de hemorragia digestiva alta. A esplenectomia constitui etapa importante das opções do tratamento cirúrgico da hipertensão portal esquistossomótica: *per si*, pode reduzir em 35 a 40% a pressão sanguínea no território da veia porta. Todavia, a remoção do baço, qualquer que seja o motivo, pode comprometer as respostas imunes do indivíduo a agressões infecciosas, particularmente àquelas provocadas por germes encapsulados. Estudos confirmam que fragmentos de tecido esplênico autoimplantados, tanto em animais de experimentação como em humanos, são capazes de se regenerar. Embora ainda motivo de controvérsia, por sofrerem necrose centrípeta e conseqüente redução de massa, existem evidências de que os enxertos esplênicos sejam capazes de manter a função do baço como órgão linfóide e que elementos do sistema imune têm seus valores circulantes recuperados. O objetivo desta pesquisa foi verificar experimentalmente o restabelecimento de subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB em autoimplantes esplênicos. Camundongos albinos fêmeas adultas de linhagens não-isogênicas do GIDE foram inicialmente divididos em 2 grupos: A - grupo controle (75 animais sadios) e B - grupo de estudo (100 animais infectados através de injeção subcutânea com 25 cercárias de *Schistosoma mansoni*); 120 dias após a infecção, animais foram aleatoriamente divididos em 6 subgrupos: A1 e B1 - baços intactos; A2 e B2 - esplenectomia parcial, com preservação do polo superior vascularizado do baço; e A3 e B3 - autoimplante de todo o tecido esplênico, fatiado, em bolsa confeccionada no grande omento. Oito animais de cada um dos 6 subgrupos foram sacrificados entre 60 e 65 dias depois de realizadas as operações, sendo resgatado o baço íntegro, o remanescente vascularizado ou os enxertos; as células mononucleares do tecido esplênico foram cultivadas e separadas para a imunofenotipagem dos linfócitos, sendo então estudadas as subpopulações de CD4, CD8 e CD45RB, pelo método de citometria de fluxo. Fragmentos do fígado de todos os animais foram analisados por microscopia óptica a fim de afastar ou confirmar, nos camundongos sadios ou esquistossomóticos, respectivamente, a presença de fibrose hepática. Fragmentos de tecido esplênico de 3 animais de cada um dos 6 subgrupos foram destinados à análise histológica. O modelo animal proposto fornece material suficiente para estudo do tecido esplênico em indivíduos esquistossomóticos, na fase crônica da doença; o exame microscópico evidenciou fibrose nos fígados de todos os animais submetidos à infecção com cercárias; todos os controles sadios apresentavam fígados com arquitetura normal. Apenas o tecido esplênico resgatado dos camundongos parasitados exibia granulomas esquistossomóticos, independente do subgrupo. A avaliação histológica não evidenciou diferenças nas polpas vermelha e branca de baços íntegros ou remanescentes esplênicos, quando comparados animais sadios entre si, ou esquistossomóticos entre si. Em relação à morfologia dos enxertos, percebeu-se a presença mais evidente de fibrose intersticial, quando comparados aos baços íntegros ou remanescentes vascularizados; essas alterações foram identificadas em todos os autoimplantes estudados, quer de animais sadios ou infectados. As subpopulações linfocitárias foram restabelecidas em autoimplantes esplênicos, tanto de animais sadios como de animais esquistossomóticos. Concluindo, não houve diferença entre os grupos de animais estudados quanto às subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB, analisadas no tecido esplênico pelo método de citometria de fluxo.

ABSTRACT

Schistosomiasis *mansoni* is an infectious disease caused by a worm (*Schistosoma mansoni*), which has the human as one of the definitive hosts. Its evolutive course. In more advanced stages, massive embolization by eggs layed in the portal venous systems by adult forms of the parasite to the hepatic parenchima occurs; this leads to inflammatory reactions in the liver structure, modifying the architecture of the organ, with granuloma formation, whose resolution causes Symmers fibrosis, histological characteristic of the chronic stage of the disease. This fibrosis causes resistance to the free passage of portal blood stream through the liver, with the consequent venous hypertension in the site of distal esophagus and gastric fundus, where varicae are formed, whose rupture can lead to episodes of upper digestive bleedings. Splenectomy is a meaningful part of surgical treatment for schistosomotic portal hypertension: *per si*, can reduce about 35 to 40% of blood pressure in portal vein territory. Despite its motivation, spleen removal may reduce immune responses of individuals to infectious challenges, mainly those caused by encapsulated germs. Studies have confirmed that spleen slices autoimplanted in animals and humans are able to regenerate. Although controversies still persist because central necrosis occurs within the implants with consequent mass reduction, it is believed that splenic implants restores spleen function as a lymphoid organ, and components of the immune system returns to previous serum levels. The purpose of this study was to experimentally verify if lymphocyte CD4, CD8 and CD45RB subsets are reestablished in autoimplanted splenic tissue. Adult female mice of GIDE non-isogenic strains were initially divided into 2 groups: A - control group (75 healthy animals) and B - study group (100 animals infected subcutaneously with 25 cercariae of *Schistosoma mansoni*); 120 days after the infection, animals of both groups were separated into 6 subgroups: A1 and B1 - intact spleens; A2 and B2 - partial splenectomy with preservation of vascularized spleen upper pole; and A3 e B3 - autoimplantation of sliced whole spleen into an omental pouch. Eight animals from each of the 6 subgroups were sacrificed between 60 and 65 days after operations, and the whole spleen, the vascular splenic remnant or autoimplants were collected. Mononuclear cells of splenic tissue were harvested and isolated for immunophenotyping; CD4, CD8 and CD45RB lymphocyte subsets were studied by flow cytometry. Liver biopsies of all animals were analysed by optic microscopy, searching for the absence or the presence of hepatic fibrosis between healthy or infected mice, respectively. Spleen tissues specimens were obtained from 3 animals of each of the 6 subgroups for histological analysis. This experimental model offers sufficient material of schistosomotic splenic tissue to be studied in the chronic stage of disease; microscopic examination showed fibrosis in livers of all animals submitted to cercariae infection; all animals in the healthy control groups showed normal livers. Only splenic tissue obtained from infected mice showed schistosomotic granulomas, no matter the subgroup. Histological analysis showed no differences in the red and white pulps of whole spleen or its remnant, when compared both healthy animals and infected mice. Interstitial fibrosis was more evident in the morphology of autoimplants, when compared to whole spleens or vascular remnants; this microscopic pattern was identified in all autoimplants, from both the control and schistosomotic animals. Lymphocyte subsets were reestablished in splenic autoimplants either from healthy or infected animals. The conclusion, therefore, is that there were no differences between all groups of animals in this study related to CD4, CD8 and CD45RB lymphocyte subsets measured in splenic tissue by flow cytometry.

1 - INTRODUÇÃO

A GRAHAM & ORR (1950) é creditada a 1ª publicação que descreve criteriosamente a associação entre abscesso hepático causado por bactérias e esquistossomose visceral; o relato do caso inclui documentação clínica, cirúrgica e histopatológica em um oficial do exército inglês, então aos 28 anos de idade, que retornava à Inglaterra após missão militar na África. A drenagem do abscesso a céu aberto e o tratamento com penicilina resolveram a infecção bacteriana induzida por estafilococos. A esquistossomose foi tratada com antimoniais por 3 semanas, até a negativação do achado de ovos do parasito nas fezes.

A esquistossomose é uma doença causada por diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, um helminto trematódeo, cuja distribuição geográfica predomina nas zonas tropicais e equatorial do globo terrestre, regiões nas quais o clima, as condições econômicas e sócio-culturais de vida da população residente favorecem a manutenção do ciclo evolutivo do verme, que tem no homem um dos seus hospedeiros definitivos. Aqui no Brasil, a doença apresenta-se de forma endêmica, prevalecendo a espécie *S. mansoni* (COELHO, 1971, VIANA, 1997).

No Nordeste do país ainda é preocupante o número de indivíduos portadores da forma avançada da infecção, potenciais pacientes cirúrgicos, por poderem apresentar hemorragia digestiva alta devida à ruptura de varizes do esôfago secundárias à hipertensão no sistema da veia porta, causada pela fibrose hepática decorrente da embolização de ovos do verme adulto (KELNER & SILVEIRA, 1997).

No HC – UFPE, uma linha de pesquisa foi iniciada há quatro décadas com o objetivo de estudar a cirurgia da hipertensão portal esquistossomótica; vários desses trabalhos têm registrado a maior susceptibilidade dos pacientes cirúrgicos portadores de esquistossomose crônica avançada às infecções pós-operatórias (KELNER et al., 1964; KELNER, 1965; KELNER et al., 1982; KELNER et al., 1992; KELNER & SILVEIRA, 1997; FERRAZ et al., 1979, 1980a, 1980b, 1982a, 1982b, 1991, 1992, 2000; SILVEIRA et al., 1987).

Segundo KELNER & SILVEIRA (1997), a racionalização da cirurgia da hipertensão portal esquistossomótica, em contraponto ao que acontece no paciente cirrótico no qual a função hepática está comprometida, baseia-se prioritariamente na redução da pressão do fluxo venoso no território da veia porta chamada “zona vulnerável”: o esôfago terminal e o fundo gástrico. Outros autores também consideram que as derivações porto-sistêmicas, empregadas a princípio para pacientes cirróticos e tendo como principal efeito colateral indesejado a

encefalopatia, se fazem contra-indicadas na esquistossomose, na qual a função hepática está preservada (RAIA et al., 1991; RAIA, 1997; ROCHA, 1997).

A esplenectomia constitui-se em uma etapa relevante de diferentes propostas para a cirurgia da hipertensão portal esquistossomótica, já que, *per si*, reduz em torno de 35 a 40% o fluxo na veia porta (KELNER et al., 1992; LACERDA, 1991; LACERDA et al., 2000; LACERDA et al., 2002).

A associação entre esplenectomia e infecções bacterianas foi originalmente discutida por MORRIS & BULLOCK (1919) em estudo experimental controlado utilizando ratos. Em 1929, O' DONNEL relatou o caso de um garoto de 6 anos de idade submetido 3 anos antes à remoção do baço por doença de Banti, que desenvolveu quadro de meningite de evolução rápida e fatal.

Mas, somente a partir de 1952, após a clássica publicação de KING & SCHUMAKER, descrevendo 5 casos de infecções graves em crianças esplenectomizadas por anemia hemolítica (com 2 óbitos), é que a comunidade científica passou a se interessar mais e aprofundar as pesquisas sobre essa relação. A denominada sepse fulminante pós-esplenectomia é geralmente causada por bactérias encapsuladas, manifestando-se sob a forma de pneumonia ou meningite.

Diversas publicações passaram a destacar o importante papel desempenhado pelo baço como o maior órgão do sistema reticuloendotelial, sede da remoção de partículas presentes na corrente circulatória e da produção de imunoglobulinas e substâncias ativadoras do mecanismo de fagocitose (ABE et al., 1988; BAKER et al., 1984; CHU et al., 1984; CONSTANTOPOULOS et al., 1973 ; HOSEA et al., 1981a, 1981b; NAJJAR, 1979, 1983; NAJJAR et al., 1968; NAJJAR & NISHIOKA, 1970; NAJJAR & CONSTANTOPOULOS, 1972; NAJJAR, 1983; NISHIOKA et al., 1973; NISHIOKA et al., 1994; PETROIANU, 1991; SPIRER et al., 1977a, 1977b, 1983; ZHANG et al., 1996; ZOLI et al., 1994).

Paralelamente, estudos clínicos sugeriram fortemente que a ausência do baço pode levar a uma deficiência da resposta imunológica, tornando os indivíduos mais susceptíveis a infecções bacterianas, algumas vezes fatais, principalmente durante a infância (ASKERGREN & BJÖRKHOLM, 1980; BALFANZ et al., 1976; CARNEIRO et al., 1986; CORY et al., 1979; ELLISON & FABRI, 1984; ERICKSON et al., 1968; FRANKE & NEU, 1981; GOPAL & BISNO, 1977; JUGENBURG et al., 1999; O'NEAL & Mc DONALD, 1981; ORDA et al., 1981; SCHWARTZ et al., 1982; STANDAGE & GOSS, 1982).

Assim, alternativas preventivas visando a redução da possibilidade de ocorrência de infecções graves têm sido propostas à condição do indivíduo esplenectomizado, tanto em animais de experimentação como em humanos. Elas variam desde a imunoestimulação inespecífica à vacinação contra os agentes mais comuns da sepse fulminante, especialmente o pneumococo, o meningococo e o hemófilo (BROWDER et al., 1981; COONEY et al., 1979; HEBERT et al., 1983; HOSEA et al., 1981b; LEEMANS et al., 1999a, 1999b; SHINEFIELD et al., 1966; TESLUK & THOMAS, 1979), assim como a antibioticoprofilaxia dirigida a esses germes (AAGERGE et al., 1984; DAJEE et al., 1982; JUGENBURG et al., 1999).

O brasileiro CAMPOS-CHRISTO (1959, 1962), passou a ser citação obrigatória na literatura após a publicação dos seus artigos relatando as primeiras séries de pacientes submetidos à cirurgia conservadora do baço no trauma esplênico; a contribuição do autor em relação à anatomia vascular segmentar do baço confirmou a possibilidade da realização de uma esplenectomia subtotal, desta forma reduzindo as chances de infecção pós-esplenectomia.

Entre cirurgiões, tornou-se um objetivo a tentativa de preservação do máximo de tecido esplênico nas ocasiões em que a esplenectomia se faz imperiosa: em decorrência de traumas severos ao órgão em humanos (AIGNER et al., 1980; ANNEXTON, 1979; BENJAMIN et al., 1978; BROWN et al., 1999; BUYUKUNAL et al., 1987; LUCAS, 1991; MILLIKAN et al., 1982; MORGENSTERN & SHAPIRO, 1979; PATEL et al., 1981; RABELO et al., 1991; SOLHEIM, 1979), em doenças hematológicas (AL-SALEM et al., 1997; BANANI, 1998; CORRY et al., 1979; FREUD et al., 1997; IDOWU & HAYES-JORDAN, 1998; KIMBER et al., 1998), e no tratamento da hipertensão portal esquistossomótica (BRANDT et al., 1995, 1996, 1997, 1998a, 1998b, 1998c, 2001; PETROIANU, 1993b, 1993c, 1997; PETROIANU & ANTUNES, 1998).

Em 1939, BUCHBINDER & LIPKOFF, após cuidadosa revisão da literatura e relatando mais um caso, haviam descrito o achado de múltiplos nódulos disseminados pela cavidade abdominal em 10 pacientes com história pregressa de trauma no abdome superior, com lesão esplênica severa, tendo todos eles sido submetidos a esplenectomia na ocasião. Tais nódulos foram removidos durante a autópsia ou outras operações, realizadas meses ou anos depois, e o estudo histopatológico revelou tratar-se de fragmentos de baço. Com base nas evidências microestruturais encontradas, os autores interpretaram o evento como a

"autotransplantação" de tecido esplênico na cavidade após trauma do baço, e ofereceram o termo "esplenose" para descrever essa condição.

A partir de então, elegantes modelos de estudos foram idealizados, procurando definir com maior precisão o mecanismo pelo qual se processa a regeneração morfológica, bem como a viabilidade funcional do tecido esplênico autoimplantado (PEARSON et al., 1978; TAVASSOLI et al., 1973; VEGA et al., 1981); na seqüência, vários desses pesquisadores, inclusive, utilizando diversas espécies de animais, confrontaram animais controle, esplenectomizados e autoimplantados com inoculações de cepas bacterianas através de diferentes vias (DICKERMAN et al., 1979; HORTON et al., 1981; PATEL et al., 1982; STEELY et al., 1988; TESLUK & THOMAS, 1979).

O autoimplante de fragmentos de tecido esplênico tem sido empregado como alternativa de manutenção da função do baço em pacientes nos quais a esplenectomia total torna-se inevitável. Estudos experimentais bem controlados têm demonstrado não só a regeneração histológica desses fragmentos de baço, assim como o restabelecimento das funções fagocítica e hemocaterética e a restauração dos níveis circulantes de mediadores imunológicos produzidos ou metabolizados pelo órgão (ALVAREZ et al., 1987; ALVES et al., 1999; DICKERMAN et al., 1979; LEITNER et al., 1994; MARTINS-TORRES et al., 1994; PATEL et al., 1982, 1986; PEARSON et al., 1978; RODRIGUES et al., 1991; TAVASSOLI et al., 1973; VEGA et al., 1981; WESTERMANN et al., 1988, 1990, 1997; ZHANG et al., 1996; ZOLI et al., 1994). Estudos realizados em seres humanos têm corroborado essas observações (ALWMARK et al., 1981; BRANDT et al., 1997, 1998; PEARSON et al., 1978; SZENDROI et al., 1993).

Questionamentos permanecem, entretanto, em especial quanto a duas variáveis envolvidas no procedimento de enxertia de fragmentos do baço removido. Primeiro, é sabido que o processo de regeneração ocorre de forma centrípeta e parte do tecido esplênico enxertado sofre necrose, reduzindo assim, a massa total funcionante quando comparada ao que foi implantado. Segundo, autores sustentam a teoria de que, quando privado de sua irrigação natural, o tecido esplênico não mais conservaria a sua capacidade de manter todas as funções antes desempenhadas; assim, argumentam que a manutenção do pólo superior do baço vascularizado pelos vasos espleno-gástricos, ou *vasa brevia*, ainda que de menor massa do que o órgão íntegro, teria melhor efeito funcional residual do que os enxertos (BRADSHAW &

THOMAS, 1982; COONEY et al., 1979; HORTON et al., 1982; MOORE et al., 1984; RICE & JAMES, 1980; SCHWARTZ et al., 1978; STEELY et al., 1988; VAN WYCK et al., 1980; WESTERMANN et al., 1988; WILLFÜHR et al., 1992).

Em 1990, o Serviço de Cirurgia Pediátrica do HC-UFPE iniciou estudo prospectivo em crianças operadas por hemorragia digestiva alta em consequência à ruptura de varizes por hipertensão portal esquistossomótica, em que o pólo superior do baço esquistossomótico removido, após ser imerso em solução gelada de ringer-lactato, é desencapsulado e fatiado em cerca de 8 a 10 fragmentos medindo aproximadamente 8x4x2 cm e pesando cerca de 10 g, cada, que logo em seguida são implantados no grande omento como procedimento rotineiro, em complementação à esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (BRANDT et al., 1995).

Resultados observados indicam que há retorno das funções hemocaterética e imunológica, mensuradas pela pesquisa de corpúsculos de Howell-Jolly no sangue periférico (BRANDT et al., 1996, 1997) e pela dosagem da tuftsina (BRANDT et al., 1998a), imunoglobulinas e componentes do sistema de complemento no soro dos pacientes (BRANDT & MACIEL, 1993, BRANDT et al., 2001). Na mesma casuística, exames cintilográficos com hemácias marcadas demonstraram a viabilidade vascular dos enxertos (BRANDT et al., 2001).

Em um dos estudos da série, foram verificadas as subpopulações de linfócitos B, T, T *helper* (CD4) e T *suppressor* (CD8) em 20 ml de sangue periférico dessas crianças, pelo método de isolamento do total de linfócitos circulantes, por centrifugação do gradiente de densidade isopícnica. Anticorpos monoclonais foram empregados para o reconhecimento da expressão das séries linfocitárias. O trabalho, no entanto, não conseguiu demonstrar o efeito isolado do tecido esplênico autoimplantado (BRANDT et al., 1995).

SANTOS et al., em 1991, descreveram o mapeamento linfocitário no folículo de baços de pacientes esquistossomóticos hepatosplênicos, comparando a baços normais removidos por trauma, pelo método de imunohistoquímica, observando uma hiperplasia dos folículos linfóides nos baços doentes, e aumento dos linfócitos T *suppressor*.

A citometria de fluxo é um método recentemente introduzido na pesquisa médica que permite quantificar, utilizando anticorpos monoclonais altamente específicos para a marcação de receptores de membrana, subpopulações celulares

em líquidos e tecidos orgânicos. Tem sido empregado com grande entusiasmo em pesquisas sobre citocinas (BRITO et al., 2000) e apoptose (CARNEIRO-SANTOS et al., 2000) na esquistossomose; em apoptose de eosinófilos (SANDSTROM, 2000), em alterações blásticas no linfoma não-Hodgkin (SPATH-SCHWALBE et al., 2000); na eritropoiese esplênica em ratos (ABRAMSSON-ZETTERBERG et al., 1997); na detecção de leucócitos no sêmen (RICCI et al., 2000); na verificação de subpopulações linfocitárias na doença celíaca (CAMARERO et al., 2000) e em alterações no percentual de CD4 no timo e no baço de pacientes submetidos a regimes dietéticos (ERF et al., 1998).

EL-CHEIKH et al. (1997), estudaram o comportamento de linfócitos B e T no baço de camundongos em diferentes fases da esquistossomose, percebendo uma modulação programada das respostas imunes inespecífica e específica à doença, à medida em que evoluía da fase aguda até a fase crônica.

MARTINS-FILHO et al. (1998), empregaram a citometria de fluxo para medir populações celulares esplênicas de pacientes cujo baço foi removido por esquistossomose hepatosplênica, comparando a baços de indivíduos esplenectomizados por ruptura traumática. No estudo, foi utilizado um grande número de anticorpos a fim de expressar antígenos de superfície e identificar subpopulações altamente específicas cujas funções na resposta imune ainda são objeto de inferências e conjecturas. Os resultados, apesar de apontarem caminhos em relação ao tema, não evidenciaram diferenças significativas entre a média percentual de subpopulações linfocitárias CD4, CD8 ou CD45RB dos esplenócitos nos baços de ambos os grupos estudados.

Os mesmos autores verificaram que a modulação das respostas imunes varia de acordo com a fase evolutiva da doença, se aguda ou crônica, envolvendo alterações nas subpopulações de linfócitos, com aumento principalmente do percentual de CD4 na fase aguda, e tanto dos percentuais de CD4 quanto de CD8 na forma hepatosplênica da esquistossomose (MARTINS-FILHO et al., 1999).

Em contrapartida, um outro estudo, realizado através da citometria de fluxo em tecido esplênico autoimplantado, ou após ligadura das artérias do baço em ratos saudáveis, verificou redução significativa nas subpopulações de linfócitos CD4 e CD8, quando comparados a baços intactos; as populações de linfócitos B e macrófagos estavam mantidas, no entanto (SMITH et al., 1999)

Entretanto, não foram encontradas referências na literatura. quanto à regeneração morfológica dos enxertos esplênicos esquistossomóticos, ou quanto a alterações do percentual de subpopulações linfocitárias no tecido esplênico esquistossomótico implantado. Pretende-se neste estudo oferecer uma contribuição à pesquisa do assunto.

Este trabalho propõe um modelo experimental a ser considerado pela possibilidade de obtenção de material de enxertos esplênicos em animais na fase crônica da esquistossomose. Aspectos sobre a regeneração histológica do tecido esplênico enxertado são discutidos.

Este estudo tem como objetivo principal observar, através da mensuração da subpopulação de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB pelo método da citometria de fluxo, o percentual dessas células presentes em fragmentos de tecido esplênico autoimplantados no grande epíplon de camundongos esquistossomóticos, na fase crônica da doença.

2 - MATERIAL E MÉTODO

2.1 - INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA

Cem (100) camundongos albinos não-isogênicos, fêmeas adultas, oriundos do biotério do GIDE da UFMG, foram infectados com aproximadamente 25 cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa BH - BH/MG), aos 2 meses de vida, conforme técnica rotineira do biotério, que consiste na injeção de 1 ml da suspensão de cercárias em solução fisiológica no tecido celular subcutâneo da nuca do animal (PELLEGRINO & MACEDO, 1955); 75 animais sadios da mesma linhagem, sexo e idade foram mantidos como controles, nas mesmas condições de vida do biotério, com ração e água *ad libitum*, no espaço máximo de 20 animais por gaiola.

O número de animais sadios e infectados com cercárias foi calculado com base na mortalidade presumida, conforme verificado em nossos estudos pilotos anteriores, realizados nas mesmas condições de experimentação.

2.2 - DESENHO DO ESTUDO

2.2.1 - Grupo A - Controle - Animais Sadios

Três grupos de camundongos sadios, aleatoriamente separados, foram mantidos como controles pareados para cada grupo de animais esquistossomóticos.

A1 - baço intacto - 15 animais

A2 - remanescente esplênico vascularizado - 30 animais

A3 - enxerto total de baço - 30 animais

2.2.2 - Grupo B - de Estudo - Animais Esquistossomóticos

Aos 120 dias após a infecção, os animais esquistossomóticos, já na fase crônica da doença, foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

B1 - baço intacto - 20 animais

B2 - remanescente esplênico vascularizado - 40 animais

B3 - enxerto total de baço - 40 animais

2.3 - BAÇO INTACTO

Nos grupos A1 e B1, ou seja, grupos controle em que os baços deveriam ser mantidos íntegros, os camundongos sadios e esquistossomóticos não foram anestesiados nem submetidos à operação simulada. Foram pesados em balança de precisão aferindo-se até décimos do grama, na mesma oportunidade em que foram pesados os animais operados.

2.4 - ANESTESIA DOS ANIMAIS

Os animais foram inicialmente sedados com diazepam, preparado em seringa milimetrada na seguinte proporção: diazepam (5 mg/ml) – 2 ml, diluídos em 2 ml de água destilada = 4 ml com 2,5 mg/ml do tranquilizante; cada animal recebeu 0,1 ml da solução, via intraperitoneal.

Foram submetidos a seguir à pesagem, para cálculo da dose do anestésico; realizada antisepsia com solução iodada e tricotomia do hipocôndrio esquerdo com lâmina de barbear, sendo então os animais anestesiados com pentobarbital, preparado em seringa milimetrada na seguinte proporção: pentobarbital sódico (100 mg/ml) – 1 ml diluído em 9 ml de água destilada = 10 ml com 10 mg/ml; foram administrados 0,07 ml da solução para cada 20 g de peso por animal, via intraperitoneal.

O efeito dos medicamentos era então avaliado, verificando-se uma total passividade do animal diante de estímulos mecânicos, porém estava mantida a frequência respiratória, sinais de haver sido atingida a adequação do plano anestésico.

2.5 - OPERAÇÕES

Nos quatro grupos restantes, as intervenções cirúrgicas foram realizadas no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UFMG, em condições de assepsia e antisepsia, com campos e instrumental esterilizados para cada grupo de 5 animais.

Através de uma incisão oblíqua subcostal esquerda, o baço foi cuidadosamente mobilizado e exteriorizado, permitindo amplo acesso aos pedículos

vasculares dos pólos inferior e superior do órgão. O inventário incluiu a pesquisa da presença de baços acessórios. A intervenção praticada, se remanescente esplênico vascularizado ou enxerto total, são descritas abaixo, em separado.

A incisão foi suturada em 2 planos, músculo-aponeurótico e tela subcutânea-pele, respectivamente, com chuleio simples de seda 5-0. O tempo operatório variou de 9 a 13 minutos, em qualquer dos grupos operados.

Os animais foram observados em gaiolas aquecidas até reassumirem a função motora (mais precoce) e a ingestão voluntária de água, o que aconteceu até o máximo de 1 hora após o término dos procedimentos; retornavam então às condições usuais do cativeiro, em gaiolas separadas para cada um desses grupos.

2.5.1 - Esplenectomia Subtotal - Remanescente Esplênico Vascularizado

Nos grupos A2 e B2, o baço teve o seu pedículo vascular inferior ligado com fio de seda 5-0 e, definida a extensão da isquemia, o órgão foi seccionado na sua porção isquêmica com lâmina metálica estéril, a cerca de 1 mm da transição, mantida intacta a irrigação do pólo superior. Atenção especial foi dedicada à hemorragia do plano de secção do baço após o reposicionamento ortotópico do remanescente esplênico; compressão suave com gaze ou, raramente, um ponto em "X" com seda 5-0, foram as alternativas empregadas, quando necessária hemostasia do tecido seccionado.

2.5.2 - Enxerto Total de Baço

Nos grupos A3 e B3, após a ligadura com fio de seda 5-0 dos pedículos vasculares, o baço foi removido, fatiado no sentido transversal com lâmina metálica estéril, em número de 5 a 8 fragmentos com espessura aproximada de 2 mm, sobre papel laminado esterilizado; esses fragmentos foram logo em seguida reimplantados em bolsa confeccionada no omento maior, ao longo da grande curvatura do estômago.

2.6 - CUIDADOS E EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIOS

Desde o início da pesquisa, todos os animais foram mantidos separados por grupos no cativeiro; as gaiolas eram limpas 2 vezes por semana e os animais acompanhados em relação ao comportamento, atividade motora, apetite e estado dos pêlos, sob as mesmas condições de vida do biotério, com ração padrão e água *ad libitum*.

Nos primeiros 7 dias após a intervenção cirúrgica, os camundongos foram examinados a cada 6 horas. Animais que apresentassem alterações nos parâmetros estudados eram isolados dos demais em gaiolas separadas para a observação mais próxima da sua evolução, registrada diariamente em protocolos individuais. Os animais que morreram durante o período do estudo foram descartados, conforme a rotina do laboratório, junto com o lixo biológico do HC/UFG.

2.7 - REDESENHO DO ESTUDO APÓS AS OPERAÇÕES

Entre o 60º e 65º dias após as operações, 11 animais foram aleatoriamente separados dos demais, dentre a população sobrevivente de cada um dos seis grupos:

2.7.1 - Grupo A - Controle - Animais Sadios

A1 - baço intacto - 11 animais

A2 - remanescente esplênico vascularizado - 11 animais

A3 - enxerto total de baço - 11 animais

2.7.2 - Grupo B - de Estudo - Animais Esquistossomóticos

B1 - baço intacto - 11 animais

B2 - remanescente esplênico vascularizado - 11 animais

B3 - enxerto total de baço - 11 animais

Em oito animais de cada grupo, o tecido esplênico resgatado pela remoção do baço íntegro, ou do remanescente esplênico ou dos enxertos de baço, de acordo com o grupo, destinou-se ao estudo de citometria de fluxo.

Nos outros três animais de cada grupo, anteriormente separados, o tecido esplênico obtido foi acondicionado em formol a 10% tamponado, e prestou-se ao estudo histopatológico.

2.8 - SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E MACROSCOPIA

Os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico, de forma seqüenciada, intercalando-se os grupos entre si. Foram sacrificados por deslocamento cervical e posicionados em decúbito dorsal, sendo realizada laparotomia ampla, na forma de "H" deitado. Aspectos da conformação externa dos animais foram observados; as vísceras abdominais, os rins e, em especial, os baços íntegros, os remanescentes esplênicos e os sítios de enxerto foram inspecionados para identificação de processos inflamatórios em atividade. Animais apresentando abscessos viscerais, da ferida cirúrgica ou do sítio de enxerto foram excluídos deste estudo.

Em todos os animais, foi observado o aspecto macroscópico do fígado quanto ao tamanho, à cor, à superfície e à presença ou não de fibrose, sendo o órgão removido e acondicionado em formol a 10% tamponado para posterior estudo histopatológico.

A identificação das peças de cada animal foi cuidadosamente protocolada por adesivos coloridos em cada recipiente utilizado nos diversos momentos do processamento laboratorial do estudo.

2.9 - MICROSCOPIA

2.9.1 - do Fígado

Todos os fígados resgatados foram submetidos a estudo de microscopia óptica em aumento de 25 a 400 X, a fim de identificar o tecido hepático dos animais sadios do grupo controle como morfologicamente normais e também verificar

histologicamente a presença das alterações características da fase crônica da esquistossomose, no grupo de estudo.

As peças foram conservadas em formol a 10% tamponado e emblocadas em parafina; os cortes histológicos medindo 4 μ de espessura foram colocadas em lâminas, coradas pelos métodos da Hematoxilina & Eosina, e do Tricrômico de Masson.

2.9.2 - do Tecido Esplênico

Os baços íntegros, remanescentes esplênicos vascularizados e enxertos totais foram cuidadosamente removidos dos três animais de cada um dos seis grupos destinados para estudo histopatológico; foram conservados, preparados em lâminas e corados pelos mesmos processamentos descritos para o tecido hepático.

Atenção especial foi dedicada ao tecido esplênico, com vistas à pesquisa de alterações comparativas entre baços esquistossomóticos crônicos e controles sadios, e intragrupos. Nos enxertos, a regeneração tecidual foi analisada verificando-se a reconstituição da cápsula esplênica, da polpa vermelha e da polpa branca, e a presença de angiogênese e de neoformação conjuntiva intersticial.

2.10 - CITOMETRIA DE FLUXO NO TECIDO ESPLÊNICO - ETAPAS

2.10.1 - Separação de Células Mononucleares

As células mononucleares foram obtidas através da maceração do tecido esplênico com êmbolo de seringa de borracha sobre peneira Sigma Cell Culture™ Screen 60 Mesh[?] com poros de 1 mm de diâmetro, suspensas em meio RPMI, acondicionadas em tubos Falcon[?], que foram imersos em gelo (- 4° C) por 30 minutos para a sedimentação dos resíduos celulares. O sobrenadante contendo as células do tecido esplênico foi aspirado com pipeta Jencons[?], ressuspenso em meio RPMI e centrifugado a 1250 rpm a 4° C por 10 minutos em centrífuga Excelsa 2 - modelo 205N - Fanem LTDA[?] - Brasil.

A seguir, o precipitado obtido foi homogeneizado no Ciclo-Mixer Clay-Adams[?] - Becton, Dickinson & Co.- Parsippany, N.J. 07054, ressuspenso em meio RPMI e

centrifugado nas condições supracitadas - este procedimento de lavagem de células foi repetido por mais 2 vezes.

A suspensão de células foi diluída 1:190 ?l em solução contendo ácido acético a 2% para lisar as hemácias; foi então homogeneizada e contada em câmara de 0,1 de profundidade - Neubauer Reichert Brighline[?] Buffalo, N.Y., com microscópio Leitz Wetzlar Neubauer Reichert Brighline[?] - Germany, em campo de alta magnificação (400 x). Para a conversão da contagem de células mononucleares a seguinte fórmula foi empregada:

nº de células contadas (leucócitos mononucleares) x 50;

dedução da equação:

Contam-se os 4 quadrados laterais de 1 mm²,
cada um dividido em 16 (1/16 mm²);
a profundidade é de 0,1 mm ou 1/10 mm; logo:

$$1/16 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm} = 1\text{mm}^3/160 \approx 64/160 \text{ mm}^3;$$

a diluição habitual é de 1:20, ou seja:

$$A/[1/20 \times 64/160] = [A/1]/[64/3200] = [A/1] \times [3200/64] = A \times 50,$$

*Onde A é igual ao número de células contadas,
nesta diluição e neste volume;*

O resultado é expresso em nº de leucócitos mononucleares por mm³ de sangue;
a sua concentração no meio de cultura foi ajustada para 1 x 10⁶ células/ml.

2.10.2 - Imunofenotipagem dos Linfócitos

Foram colocados 100 ?l da suspensão de células mononucleares em tubos de poliestireno de 12 x 70 mm³, aos quais foram adicionados 10 ?l dos seguintes anticorpos: FL₂ (controle); CD3 (clone 29B); CD4 (clone 129.19); CD8 (clone 53-6.7) e CD45RB (clone RA3-6B2), especificação R - Phycoerythrin Conjugate Purified Rat Immunoglobulin Monoclonal Anti-Mouse, da Sigma Immuno Chemicals[?], contendo fluoresceína verde FSC, em capela de fluxo laminar Sterilgard Hood, The Baker Co.[?], Sanford - Maine - USA, e decantados em geladeira a 4º C por 30 minutos.

Toda esta etapa de preparação do experimento foi efetuada ao abrigo da luz, a fim de evitar a fluorescência espontânea.

Após esse tempo, à suspensão de células contendo os anticorpos foram adicionados 200 µl de PBS a 1%, sendo os tubos de poliestireno homogeneizados e centrifugados conforme descrição anterior. Desprezado o sobrenadante, foram adicionados 100 µl de solução de lise de hemácias, realizada homogeneização no vórtex e, após 1 minuto, lavada a suspensão com PBS a 1%, interrompendo a reação. Nova centrifugação-padrão foi efetuada, por 10 minutos.

2.10.3 - Leitura e Registro Gráfico

Desprezado o sobrenadante, a cada tubo foram adicionados 300 µl de meio MFF (Max Facs Fix²), decantados em geladeira por 30 minutos e, após homogeneização, realizada leitura no FacScalibur Becton Dickinson² no programa Cell Quest versão 1.2 - Mc Intosh².

A expressão gráfica do tecido esplênico de cada animal obtida no citômetro de fluxo foi documentada em impressão colorida e os valores percentuais das subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB foram submetidos ao processamento e análise estatística.

2.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas a média aritmética e o desvio-padrão do peso dos animais de cada um dos seis grupos e comparados por análise de variância.

Inicialmente, para o estudo das subpopulações linfocitárias no tecido esplênico, foram calculadas a média aritmética e o desvio-padrão das variáveis dependentes, CD4, CD8 e CD45RB, em cada um dos grupos e subgrupos.

Posteriormente, procedeu-se à análise univariada, comparando-se as médias aritméticas de cada uma das variáveis dependentes entre os subgrupos, baço intacto, com remanescente esplênico vascularizado e com enxerto total de baço, no grupo de camundongos saudáveis (A1, A2 e A3) e no grupo de camundongos esquistossomóticos (B1, B2 e B3), respectivamente. Em cada um dos grupos, foram comparadas as médias entre baço intacto e remanescente esplênico vascularizado

(A1 e A2; B1 e B2), entre baço intacto e enxerto total de baço (A1 e A3; B1 e B3) e entre remanescente esplênico vascularizado e enxerto total de baço (A2 e A3; B2 e B3).

Foi realizada também a comparação das médias aritméticas de cada uma das variáveis dependentes entre os mesmos subgrupos, baço intacto, remanescente esplênico vascularizado e enxerto total de baço, dos grupos de camundongos sadios e esquistossomóticos (A1 e B1; A2 e B2; A3 e B3).

Em uma e outra situação, intra e intergrupos, a significância estatística da comparação de médias foi avaliada pelo teste t de Student, bicaudal, para amostras independentes, supondo-se a igualdade das variâncias na população. Rejeitou-se a hipótese nula quando a probabilidade de acaso foi menor do que 5%.

Finalmente, como forma de avaliar de modo integral o efeito das duas variáveis independentes, exposição à operação e exposição à doença, sobre cada uma das variáveis dependentes, procedeu-se à regressão linear múltipla pelo método "enter", sendo a significância estatística da análise de variância avaliada pelo teste F. Também neste caso a hipótese nula somente foi rejeitada quando a probabilidade de acaso foi menor do que 5%.

Todos os dados foram processados e analisados no programa de microinformática SPSS⁷.

3 - RESULTADOS

3.1 - MORTALIDADE

Nenhum camundongo operado morreu no pós-operatório imediato; ainda que obedecendo os princípios da experimentação em animais e apesar de todos os cuidados pré, trans e pós-operatórios, a mortalidade estimada é de aproximadamente 20% entre os animais sadios e de até 30% entre os animais esquistossomóticos, submetidos às operações propostas nesta pesquisa.

A mortalidade geral da população inicial de camundongos, por ocasião do sacrifício, foi menor do que o esperado entre animais sadios (16 de 75 - 12%), e também entre animais esquistossomóticos (22 de 100 - 22%); não houve, portanto, comprometimento do número de animais disponíveis para a pesquisa.

3.2 - PESO DOS ANIMAIS

Não houve diferença significativa entre os seis grupos de animais em relação ao peso; a tabela 1 apresenta os valores da média de peso por grupo com o respectivo desvio-padrão e a análise comparativa global.

Tabela 1 - Peso dos camundongos por grupo, em gramas

Grupo	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Média	32,52	29,18	31,00	32,93	32,11	31,33
DP	3,10	5,25	5,57	3,51	3,87	3,87

p > 0,05

3.3 - PATOLOGIA

3.3.1 - Macroscopia

À necrópsia, o exame minucioso do cadáver ainda fresco evidenciou diferenças entre os animais sadios e os esquistossomóticos.

Os camundongos parasitados apresentavam-se visivelmente espoliados, consumidos, com queda de pelos e redução da massa muscular esquelética; percebia-se aumento expressivo do volume abdominal, especialmente quando posicionados em decúbito dorsal; pela transparência da parede abdominal

adelgada era possível a visualização de hepatomegalia e ascite. Nos animais sadios essas alterações não foram detectadas.

À laparotomia, graus variáveis de ascite eram verificados entre os animais doentes; apresentavam significativa hepatoesplenomegalia, sendo a coloração do fígado universalmente acinzentada e sem brilho, com a superfície discretamente irregular, granulosa, conferindo ao órgão um aspecto fibrótico, o que sugeria fortemente à macroscopia, o seu comprometimento pela embolização dos ovos do parasito.

O fígado e o baço dos camundongos sadios, quando comparados aos dos camundongos esquistossomóticos, apresentavam, invariavelmente, volumes sensivelmente menores, harmônicos com as demais vísceras abdominais e com o tamanho e o peso do animal; a coloração do fígado situava-se entre o vinho e o róseo, e sua superfície era lisa e brilhante.

Nos grupos de animais submetidos a esplenectomia polar inferior, tanto entre os sadios como entre os infectados, o remanescente esplênico foi sempre identificado sem dificuldades, na sua localização normal no hipocôndrio esquerdo; sua mobilização em monobloco com a porção mais alta da grande curvatura do estômago e a inspeção cuidadosas permitiram verificar a preservação do pedículo vascular do polo superior do baço, nutrido pelos vasos esplenogástricos.

Em todos os animais esquistossomóticos e sadios submetidos ao autoimplante de fragmentos esplênicos conforme a técnica antes descrita, foi possível o resgate dos enxertos. Quantidades variáveis de material foram coletadas, em sua maior parte aderidas ao grande omento ou ao longo da grande curvatura do estômago; outros sítios de implante, em muito menor proporção, foram o mesentério e o tecido adiposo da pelve.

O volume total de tecido esplênico obtido individualmente por animal foi sempre suficiente para a obtenção das células para a realização da citometria de fluxo ou para a confecção das lâminas para o estudo histopatológico.

3.3.2 - Microscopia

3.3.2.1 - do Fígado

O estudo revelou, no fígado dos animais sadios, a normalidade da arquitetura do órgão em relação à estrutura dos hepatócitos e também dos sinusóides e espaços porta (Fig. 1).

Entre os animais esquistossomóticos, a análise histológica evidenciou neoformação conjuntiva portal e periportal de moderada a intensa no parênquima hepático (graus II e III pela classificação de COELHO, 1971), com a presença de diferentes tipos celulares, dependendo da fase evolutiva do granuloma.

Essa reação pôde ser percebida em torno dos ovos ou vermes adultos embolizados, nos granulomas mais recentes; houve porém, o predomínio de granulomas maduros, cicatriciais, caracterizando a principal alteração morfológica do fígado na fase crônica da esquistossomose mansônica, a fibrose, levando a modificações da estrutura hepática e alargamento dos espaços porta (Fig. 2).

3.3.2.2 - do Tecido Esplênico

As alterações histológicas observadas no parênquima do baço íntegro não foram tão diferentes entre os camundongos sadios e esquistossomóticos; vale salientar que, apesar da presença de alguns granulomas identificados no tecido esplênico de animais esquistossomóticos, as modificações estruturais não foram significativas, ficando conservada a morfologia das polpas vermelha e branca (Fig. 3 e 4).

Também o estudo microscópico do remanescente esplênico vascularizado não revelou maiores diferenças entre os animais sadios e os parasitados. Assim como nos baços íntegros, estava mantida a arquitetura peculiar do órgão, caracterizada pela subdivisão em polpa vermelha e polpa branca (Fig. 5 e 6).

Nos enxertos, a microscopia evidenciou características comuns à regeneração do tecido esplênico, tanto nos animais sadios como nos esquistossomóticos. Observou-se reação fibrótica em torno do enxerto (Fig. 7 e 8), o que indica que a regeneração do tecido ocorre em sentido centrípeto, com as camadas mais centrais sofrendo um processo de necrose e reabsorção dos

componentes celulares; esse fato explica a redução da massa de tecido resgatado em relação à quantidade volumétrica do tecido implantado.

Por fim, o exame microscópico dos enxertos também confirmou a reestruturação dos diferentes componentes do tecido esplênico normal, ou seja: formação da arteríola centrofolicular, da polpa vermelha, e da polpa branca; foi também identificada a presença de megacariócitos (Fig. 9 e 10 e Fig. 11 e 12).

Importantes são as observações relativas à angiogênese dos enxertos, com a identificação dos vasos neoformados a partir de brotos vasculares endotelizados, estabelecendo anastomoses com os vasos mais próximos ao sítio de implante, geralmente artérias e veias próprias do sistema mesentérico e porta, respectivamente.

3.4 - CITOMETRIA DE FLUXO

O desenho do modelo experimental permitiu analisar, pela citometria de fluxo, duas diferentes variáveis em relação ao percentual das subpopulações de linfócitos do tecido esplênico resgatado, considerados os 6 grupos de camundongos estudados: 1 - a exposição à intervenção cirúrgica; e 2 - a exposição à doença esquistossomótica.

A tabela 2 mostra, pelo teste t de Student, que não houve diferença estatisticamente significativa no percentual da subpopulação de CD4 resgatada do baço íntegro, do enxerto total ou do remanescente vascularizado de camundongos sadios.

Tabela 2 - Média e desvio-padrão de CD4 nos grupos de camundongos sadios

Camundongos Sadios	Média	Desvio-padrão
Baço intacto (A1)	28,09	4,76
Remanescente vascularizado (A2)	28,97	5,10
Enxerto total de baço (A3)	35,95	11,81

Teste t

A1 e A2 - $t = -0,37$; $p > 0,05$

A1 e A3 - $t = -1,74$; $p > 0,05$

A2 e A3 - $t = 1,69$; $p > 0,05$

A tabela 3 compara o percentual da subpopulação de CD4 resgatada do baço íntegro, do enxerto total ou do remanescente vascularizado de camundongos esquistossomóticos. Constata-se que não existe diferença entre baço íntegro e remanescente vascularizado; porém, ambos os grupos são diferentes do grupo de enxerto total.

Tabela 3 - Média e desvio-padrão de CD4 nos grupos de camundongos esquistossomóticos

Camundongos Esquistossomóticos	Média	Desvio-padrão
Baço intacto (B1)	25,80	4,01
Remanescente vascularizado (B2)	23,58	7,29
Enxerto total de baço (B3)	35,00	6,78

Teste t

B1 e B2 - $t = 0,77$; $p > 0,05$

B1 e B3 - $t = -3,16$; $p = 0,01$

B2 e B3 - $t = 3,29$; $p = 0,01$

A tabela 4 compara a interferência da variável doença esquistossomótica, em relação ao percentual da subpopulação de CD4 no tecido esplênico resgatado de camundongos sem a doença; não houve diferença entre os grupos pareados quanto à intervenção realizada.

Tabela 4 - Média e desvio-padrão de CD4 nos grupos de camundongos sadios e esquistossomóticos

Camundongos Sadios	Média	Desvio-padrão	Camundongos Esquistossomóticos	Média	Desvio-padrão	T	p
Baço intacto (A1)	28,09	4,76	Baço intacto (B1)	25,80	4,01	1,04	>0,05
Remanescente vascularizado (A2)	28,97	5,10	Remanescente vascularizado (B2)	23,58	7,29	1,92	>0,05
Enxerto total de baço (A3)	35,95	11,81	Enxerto total de baço (B3)	35,00	6,78	0,28	>0,05

A tabela 5 apresenta a média e o desvio-padrão do percentual da subpopulação CD8 resgatada dos diferentes procedimentos adotados nos animais sadios; não houve diferença entre os grupos.

Tabela 5 - Média e desvio-padrão de CD8 nos grupos de camundongos sadios

Camundongos Sadios	Média	Desvio-padrão
Baço intacto (A1)	17,33	6,63
Remanescente vascularizado (A2)	16,57	6,88
Enxerto total de baço (A3)	13,19	4,71

Teste t

A1 e A2 - $t = 0,24$; $p > 0,05$

A1 e A3 - $t = 1,44$; $p > 0,05$

A2 e A3 - $t = -1,18$; $p > 0,05$

A tabela 6 demonstra que o percentual da subpopulação CD8 do tecido esplênico resgatado dos camundongos esquistossomóticos é diferente entre os grupos baço íntegro e remanescente vascularizado; não há diferença no grupo enxerto total quando comparado isoladamente aos demais.

Tabela 6 - Média e desvio-padrão de CD8 nos grupos de camundongos esquistossomóticos

Camundongos Esquistossomóticos	Média	Desvio-padrão
Baço intacto (B1)	18,26	5,18
Remanescente vascularizado (B2)	11,58	5,34
Enxerto total de baço (B3)	14,77	4,87

Teste t

B1 e B2 - $t = 2,67$; $p = 0,02$

B1 e B3 - $t = 1,39$; $p > 0,05$

B2 e B3 - $t = 1,31$; $p > 0,05$

A tabela 7 compara a interferência da variável doença esquistossomótica, em relação ao percentual da subpopulação de CD8 no tecido esplênico de animais sadios; não houve diferença entre os grupos pareados quanto à intervenção realizada.

Tabela 7 - Média e desvio-padrão de CD8 nos grupos de camundongos sadios e esquistossomóticos

Camundongos Sadios	Média	Desvio-padrão	Camundongos Esquistossomóticos	Média	Desvio-padrão	t	p
Baço intacto (A1)	17,33	6,63	Baço intacto (B1)	18,26	5,18	-0,31	>0,05
Remanescente vascularizado (A2)	16,57	6,88	Remanescente vascularizado (B2)	11,58	5,34	1,81	>0,05
Enxerto total de baço (A3)	13,19	4,71	Enxerto total de baço (B3)	14,77	4,87	-0,66	>0,05

A tabela 8 mostra que, entre os grupos de camundongos sadios submetidos às diferentes intervenções, considerando o percentual da subpopulação de linfócitos CD45RB, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Tabela 8 - Média e desvio-padrão de CD45RB nos grupos de camundongos sadios

Camundongos Sadios	Média	Desvio-padrão
Baço intacto (A1)	50,78	9,68
Remanescente vascularizado (A2)	51,97	8,57
Enxerto total de baço (A3)	43,97	14,28

Teste t

A1 e A2 - $t = -0,28$; $p > 0,05$

A1 e A3 - $t = 1,12$; $p > 0,05$

A2 e A3 - $t = -0,15$; $p > 0,05$

A tabela 9 demonstra que não houve diferença no percentual da subpopulação de linfócitos CD45RB resgatada do tecido esplênico entre os grupos enxerto total e remanescente vascularizado de camundongos esquistossomóticos, como também não existiu diferença entre o grupo baço intacto comparado aos demais.

Tabela 9 - Média e desvio-padrão de CD45RB nos grupos de camundongos esquistossomóticos

Camundongos Esquistossomóticos	Média	Desvio-padrão
Baço intacto (B1)	51,37	5,56
Remanescente vascularizado (B2)	52,67	9,60
Enxerto total de baço (B3)	41,76	12,02

Teste t

B1 e B2 - $t = -0,34$; $p > 0,05$

B1 e B3 - $t = 2,05$; $p > 0,05$

B2 e B3 - $t = -2,14$; $p = 0,05$

A tabela 10 avalia a interferência da variável doença esquistossomótica, em relação ao percentual da subpopulação de CD45RB no tecido esplênico de animais saudios; não houve diferença entre os grupos pareados quanto à intervenção realizada.

Tabela 10 - Média e desvio-padrão de CD45RB nos grupos de camundongos saudios e esquistossomóticos

Camundongos Saudios	Média	Desvio-padrão	Camundongos Esquistossomóticos	Média	Desvio-padrão	T	P
Baço intacto (A1)	50,78	9,68	Baço intacto (B1)	51,37	5,56	-0,15	>0,05
Remanescente vascularizado (A2)	51,97	8,57	Remanescente vascularizado (B2)	52,67	9,60	-0,17	>0,05
Enxerto total de baço (A3)	43,97	14,28	Enxerto total de baço (B3)	41,76	12,02	0,33	>0,05

A tabela 11 avalia o efeito independente das variáveis doença e intervenção, sobre as subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB, através do método da regressão linear múltipla. Observa-se que a exposição à doença e/ou a exposição à intervenção cirúrgica não produziram alterações nessas subpopulações celulares.

Tabela 11 - Regressão linear múltipla para a associação entre as variáveis independentes e cada uma das variáveis dependentes

Variáveis	Coeficientes* Beta	t**	p
CD4			
Exposição à doença	- 0,200	- 1,440	> 0,05
Exposição à intervenção	- 0,066	- 0,470	> 0,05
R ² = 0,045; ANOVA F = 1,14; p > 0,05			
CD8			
Exposição à doença	- 0,098	- 0,711	> 0,05
Exposição à intervenção	- 0,253	- 1,839	> 0,05
R ² = 0,073; ANOVA F = 1,943; p > 0,05			
CD45RB			
Exposição à doença	- 0,011	- 0,078	> 0,05
Exposição à intervenção	0,073	0,512	> 0,05
R ² = 0,005; ANOVA F = 0,134; p > 0,05			

(*) Ajustados; (**) Teste t de Student

Observar os gráficos referentes à citometria de fluxo das variáveis dependentes e independentes (gráficos de 1 a 48).

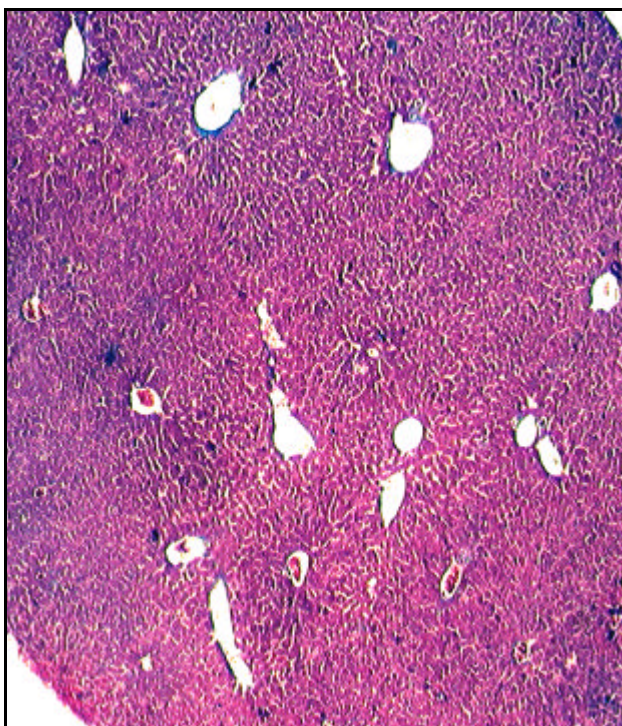


Figura 1 – Histologia normal do fígado de camundongo sadio (50X, Tricrômico de Masson).

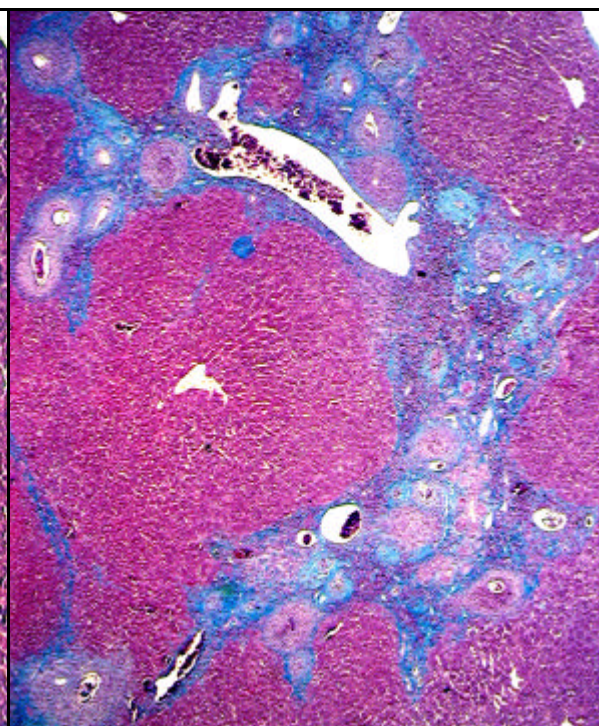


Figura 2 – Histologia do fígado de camundongo esquistossomótico; são observadas fibrose portal e granulomas (25X, Tricrômico de Masson).

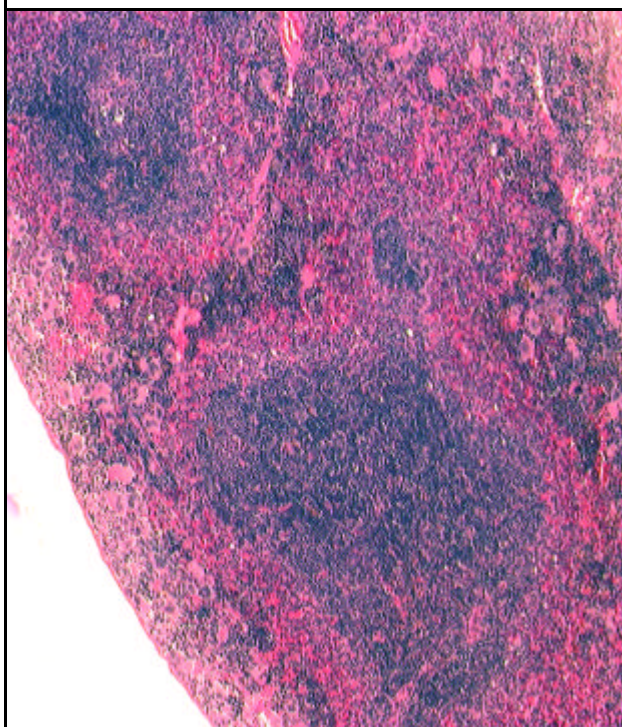


Figura 3 – Histologia normal do baço intacto de camundongo sadio (50X, H&E).

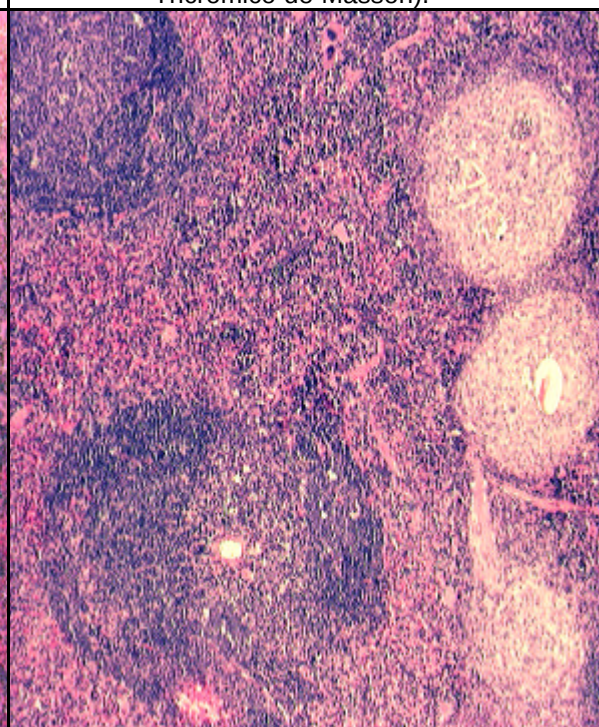


Figura 4 – Histologia do baço intacto de camundongo esquistossomótico; granulomas à direita do campo (50X, H&E).



Figura 5 – Histologia do remanescente esplênico vascularizado de camundongo sadio; não são observadas alterações histológicas significativas em relação ao baço intacto (50X, H&E).

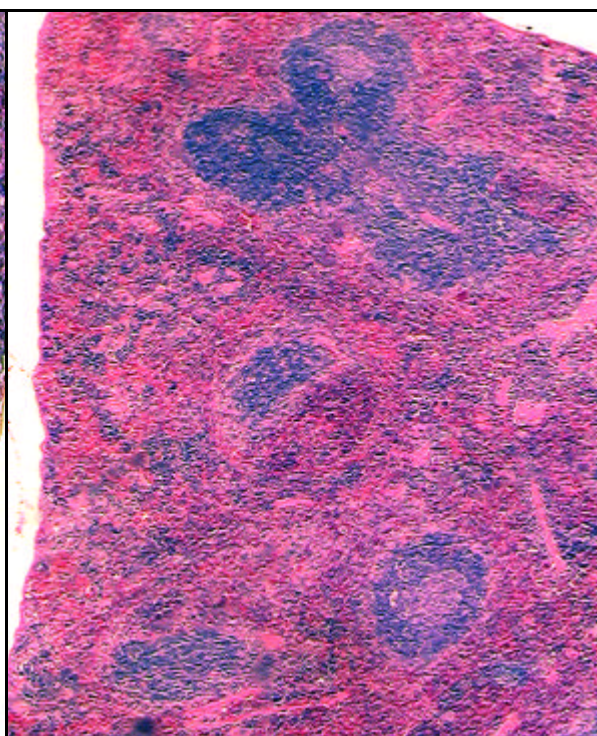


Figura 6 – Histologia do remanescente esplênico vascularizado de camundongo esquistossomótico; não são observadas alterações histológicas significativas em relação ao baço intacto (25X, H&E).

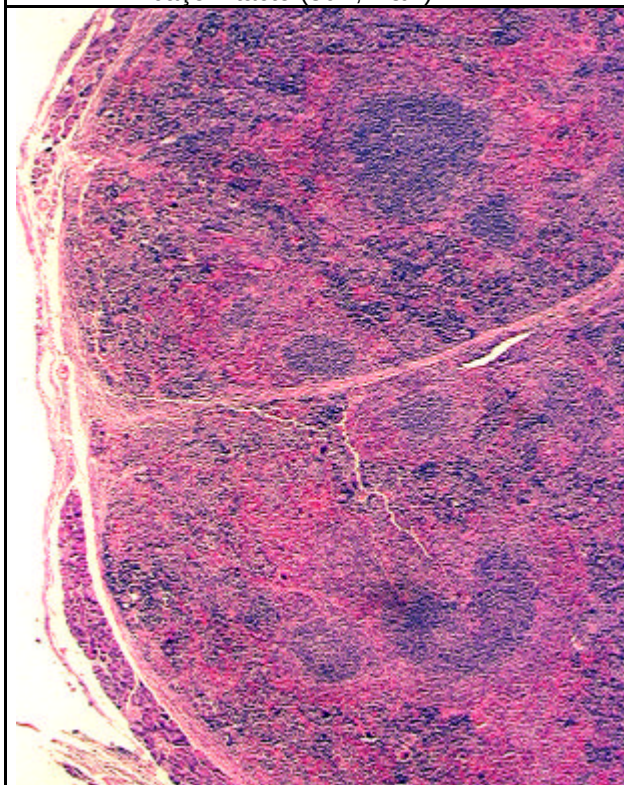


Figura 7 – Histologia de enxerto do baço de camundongo sadio; polpas branca e vermelha regeneradas e fibrose intersticial (25X, H&E).

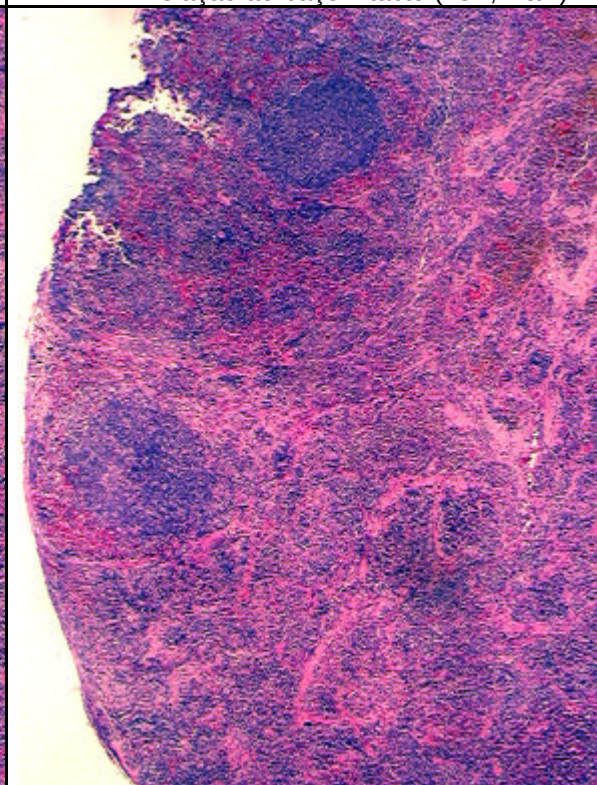


Figura 8 – Histologia de enxerto do baço de camundongo esquistossomótico; polpas branca e vermelha regeneradas e fibrose intersticial (25X, H&E).

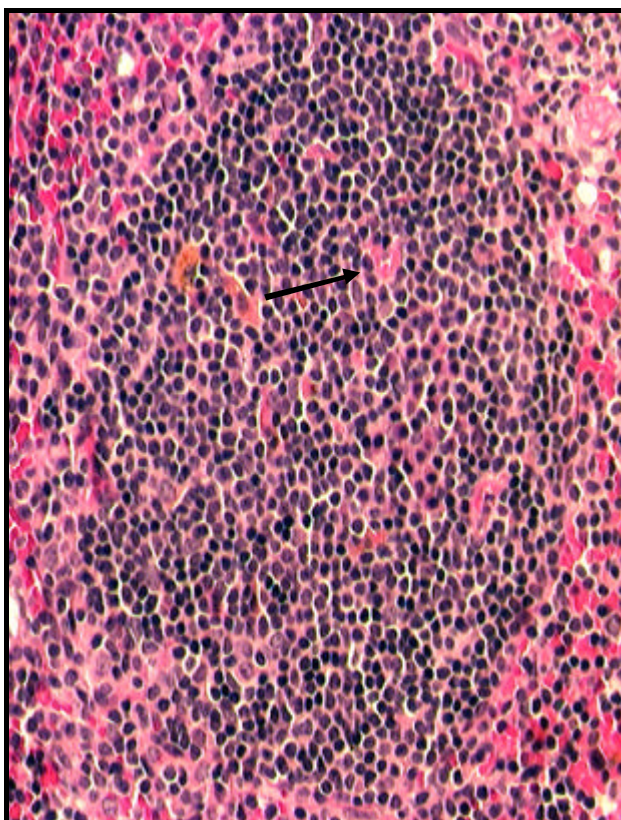


Figura 9 – Histologia de folículo linfóide do baço intacto de camundongo sadio; unidade folicular normal da polpa branca. Arteríola centrofolicular (em seta) (400X, H&E).

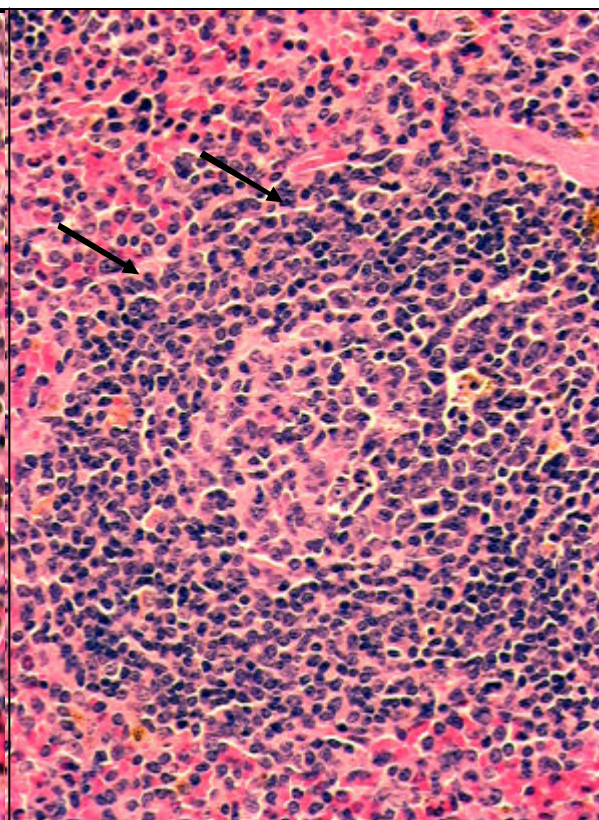


Figura 10 – Histologia de folículo linfóide do baço intacto de camundongo esquistossomótico; proliferação de linfócitos maduros perifoliculares (em setas) (400X, H&E).

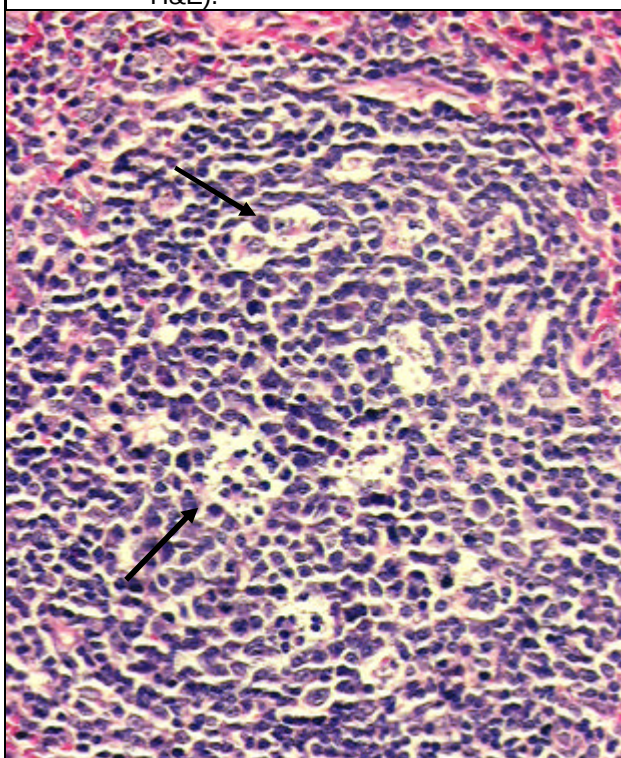


Figura 11 – Histologia de folículo linfóide de enxerto do baço de camundongo sadio; centro germinativo definido e ativado (em setas) (400X, H&E).

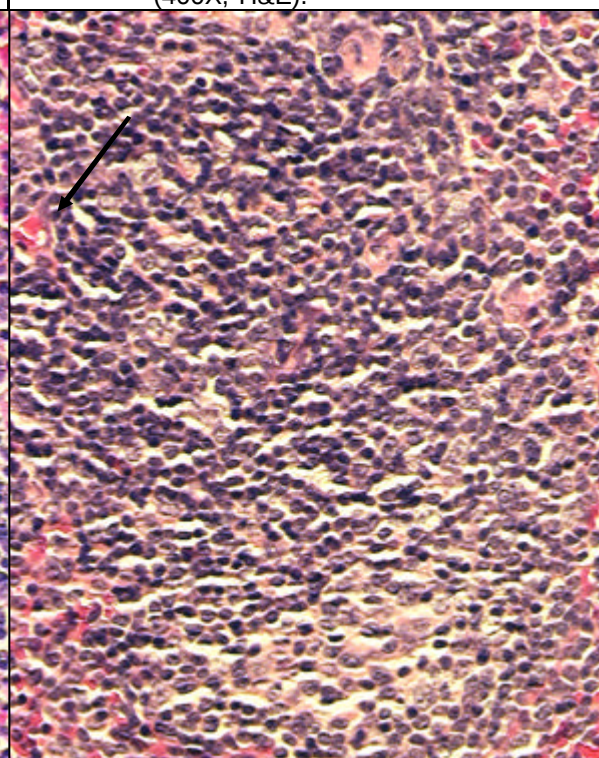


Figura 12 – Histologia de folículo linfóide de enxerto do baço de camundongo esquistossomótico; centro germinativo definido. Arteríola centrofolicular (em seta) (400X, H&E).

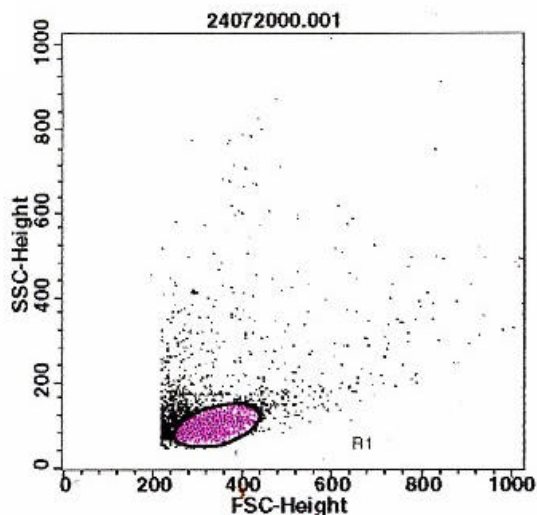


Gráfico 1 – Gate controle de células mononucleares
Grupo A1

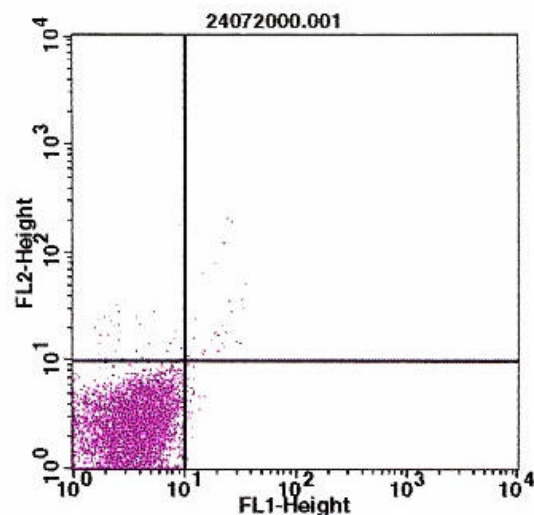


Gráfico 2 – População controle-negativo de linfócitos
Grupo A1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6455
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: PT SNO1
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	39	0.60	0.39	4.17	21.82
UR	34	0.53	0.34	20.29	35.10
LL	6343	98.26	63.43	3.84	2.70
LR	39	0.60	0.39	11.30	4.43

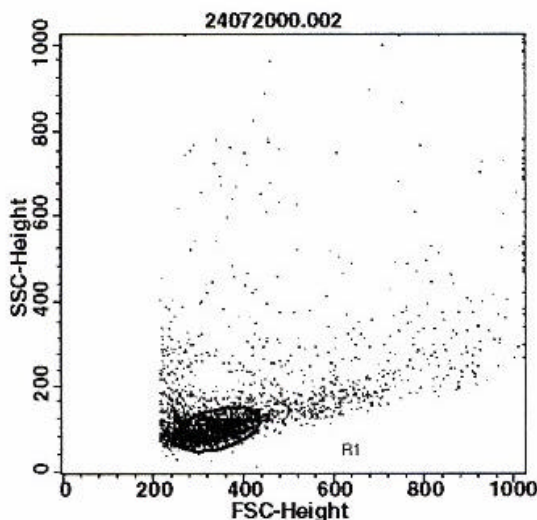


Gráfico 3 – Gate controle de linfócitos CD4
Grupo A1

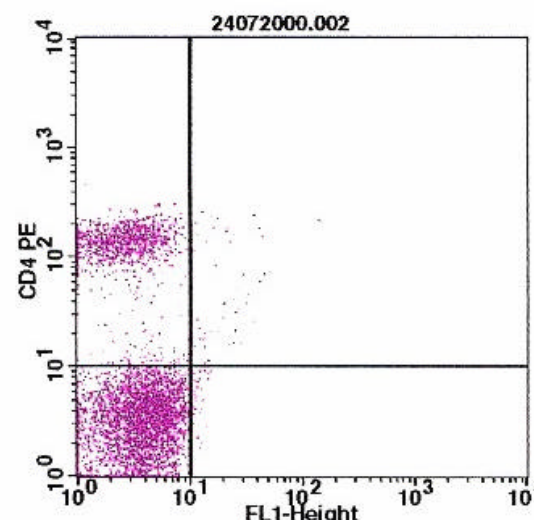
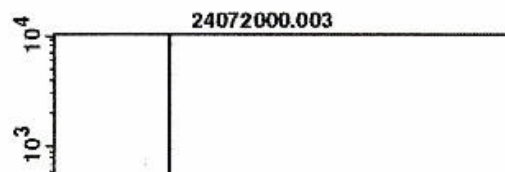
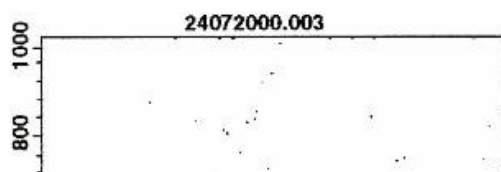


Gráfico 4 – População de linfócitos CD4
Grupo A1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6025
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: PT SNO1
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD4 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1287	21.36	12.87	3.11	134.18
UR	52	0.86	0.52	23.95	78.04
LL	4634	76.91	46.34	4.14	3.58



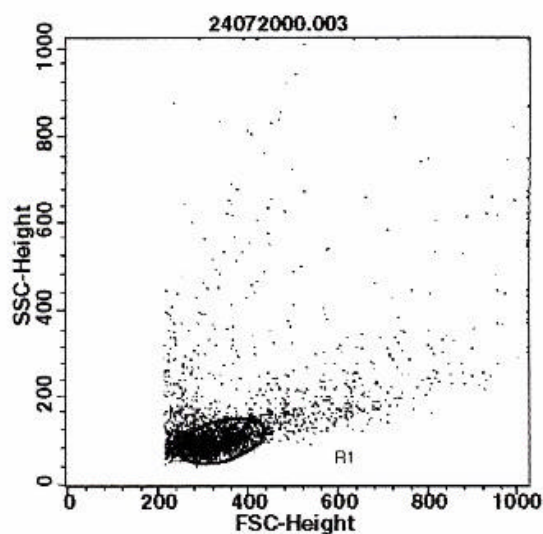


Gráfico 5 – Gate controle de linfócitos CD8
Grupo A1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6329
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

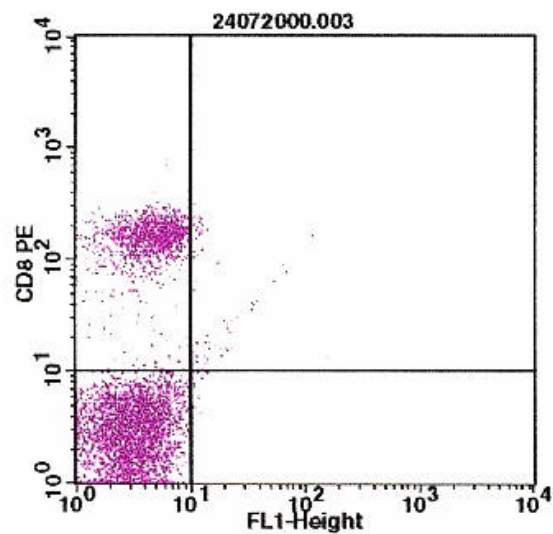


Gráfico 6 – População de linfócitos CD8
Grupo A1

Sample ID: PT SNO1
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD8 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1729	27.32	17.29	4.93	160.55
UR	76	1.20	0.76	18.72	101.63
LL	4505	71.18	45.05	3.41	3.12
LR	19	0.30	0.19	11.44	6.51

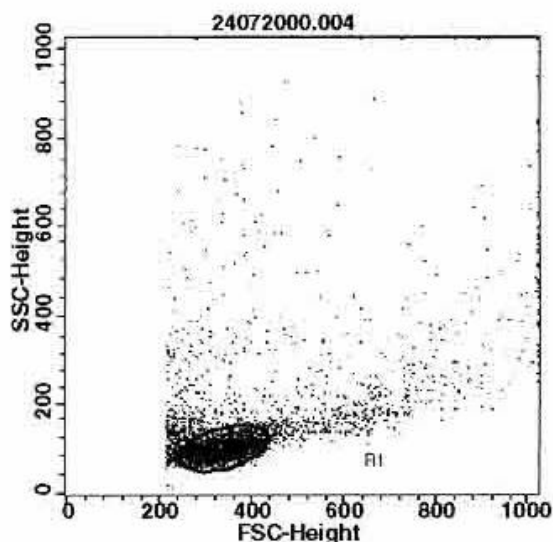


Gráfico 7 – Gate controle de linfócitos CD45RB
Grupo A1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6028
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

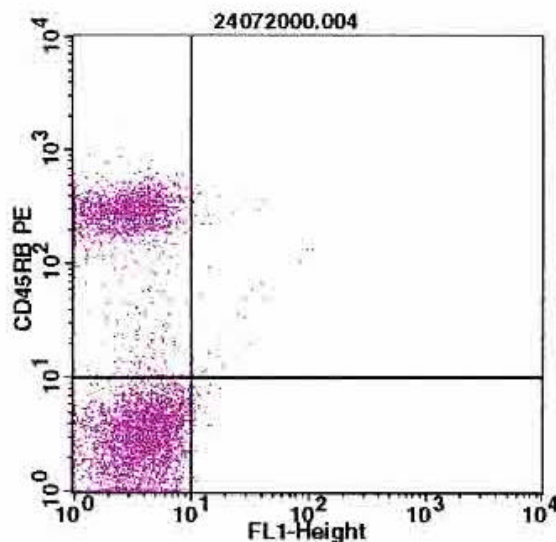


Gráfico 8 – População de linfócitos CD45RB
Grupo A1

Sample ID: PT SNO1
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD45RB PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	2148	35.63	21.48	3.38	278.76
UR	60	1.00	0.60	24.00	163.77
LL	3770	62.54	37.70	4.10	3.29
LR	50	0.83	0.50	11.48	5.16

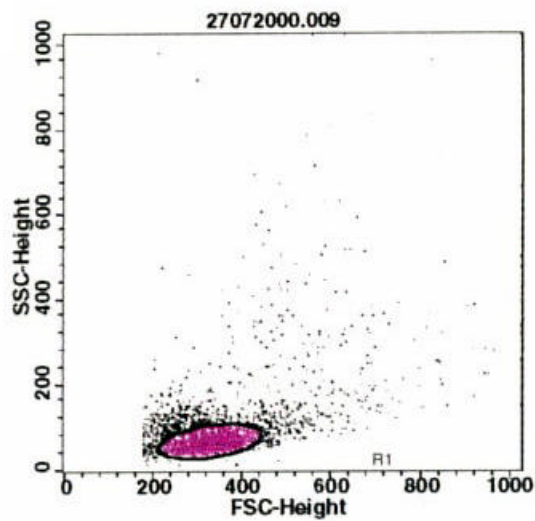


Gráfico 9 – Gate controle de células mononucleares Grupo A2

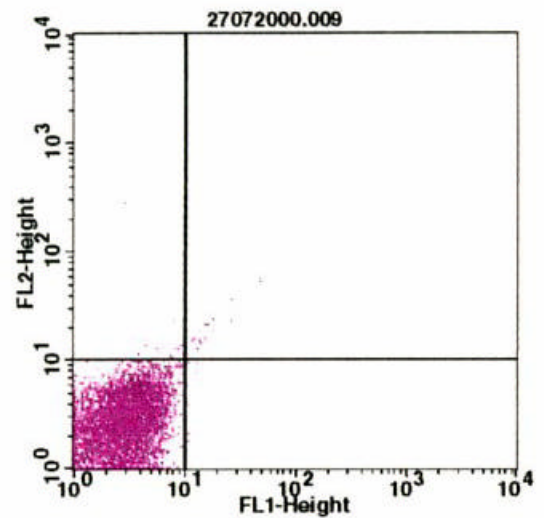


Gráfico 10 – População controle-negativo de linfócitos Grupo A2

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID: EX VIVO BACO
 Gated Events: 7057
 X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: AZ SRE10
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	22	0.31	0.22	6.51	53.54
UR	20	0.28	0.20	18.72	22.01
LL	7006	99.28	70.06	3.09	2.93
LR	9	0.13	0.09	11.26	5.42

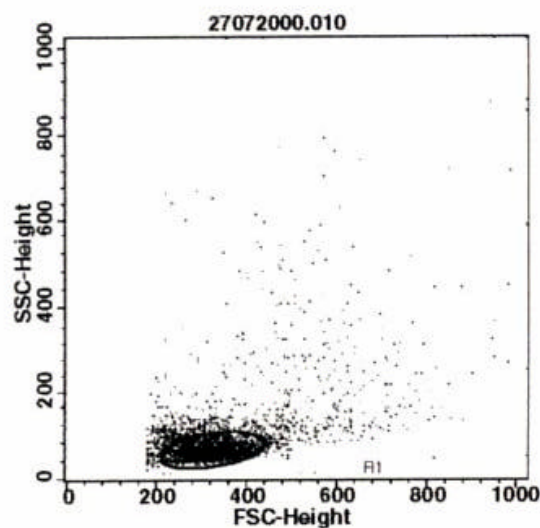


Gráfico 11 – Gate controle de linfócitos CD4 Grupo A2

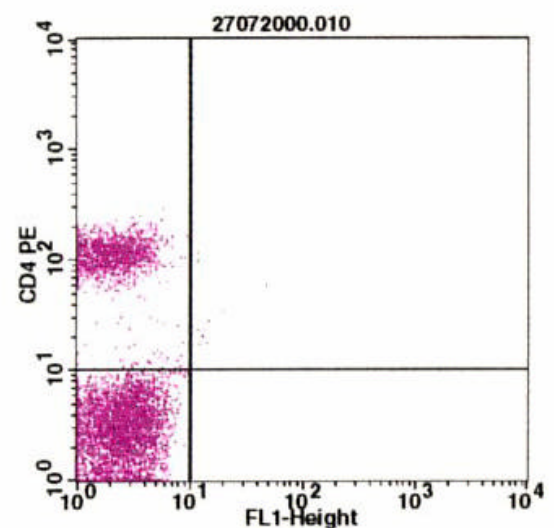


Gráfico 12 – População de linfócitos CD4 Grupo A2

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID: EX VIVO BACO
 Gated Events: 6888
 X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: AZ SRE10
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL2-H CD4 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	2092	30.37	20.92	2.20	113.59
UR	16	0.23	0.16	16.57	43.82
LL	4780	69.40	47.80	2.70	3.22
LR	0	0.00	0.00	***	***

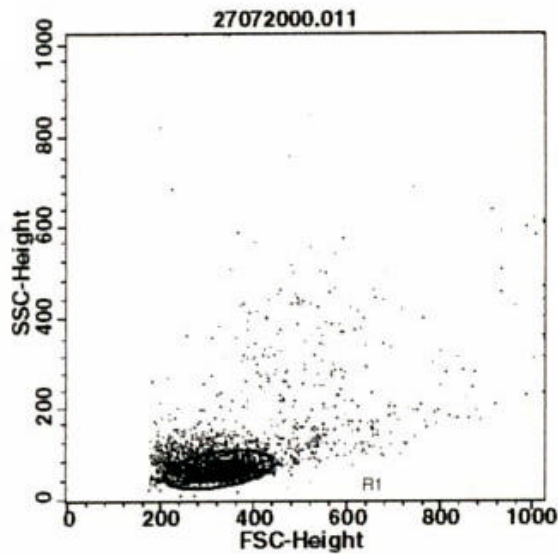


Gráfico 13 – Gate controle de linfócitos CD8
Grupo A2

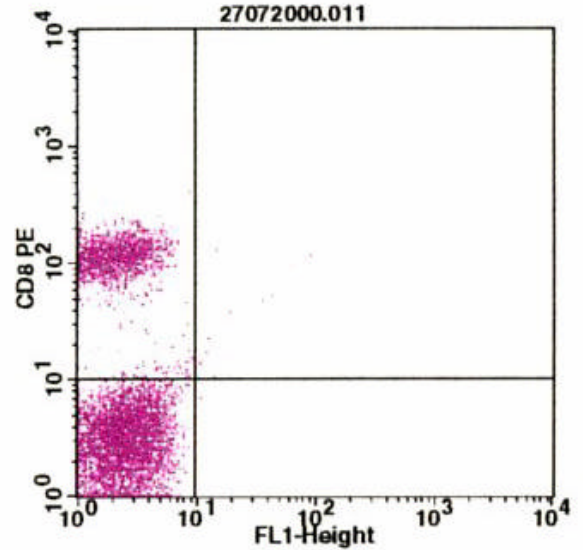


Gráfico 14 – População de linfócitos CD8
Grupo A2

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 7011
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: AZ SRE10
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD8 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	2121	30.25	21.21	2.29	114.38
UR	15	0.21	0.15	25.63	43.16
LL	4874	69.52	48.74	2.68	3.28
LR	1	0.01	0.01	10.94	6.79

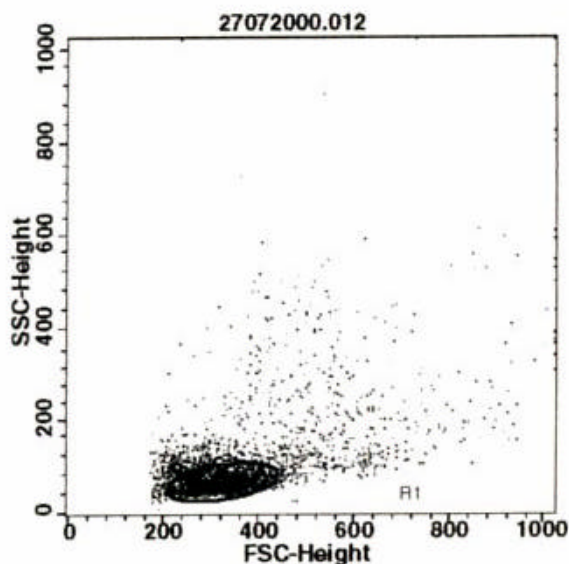


Gráfico 15 – Gate controle de linfócitos CD45RB
Grupo A2

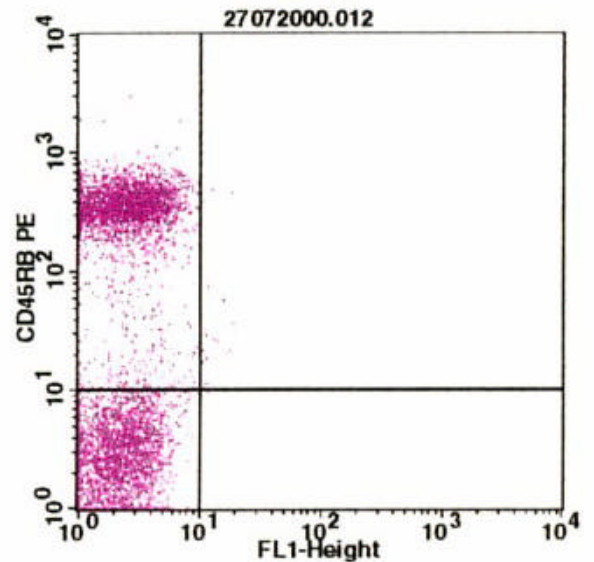


Gráfico 16 – População de linfócitos CD45RB
Grupo A2

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6676
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: AZ SRE10
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD45RB PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	3716	55.66	37.16	2.69	353.34
UR	27	0.40	0.27	14.67	89.45
LL	2931	43.90	29.31	2.44	3.32
LR	2	0.03	0.02	10.96	9.36

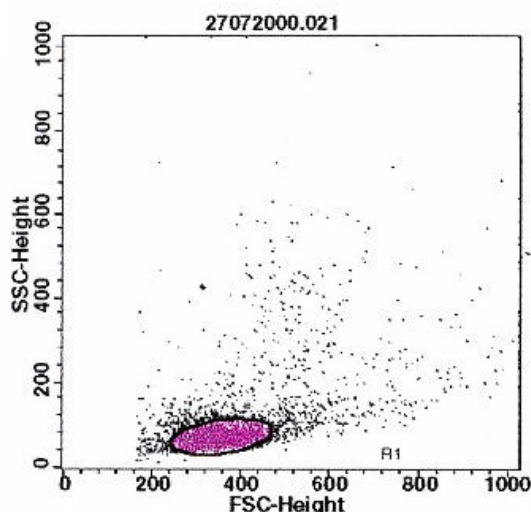


Gráfico 17 – Gate controle de células mononucleares
Grupo A3

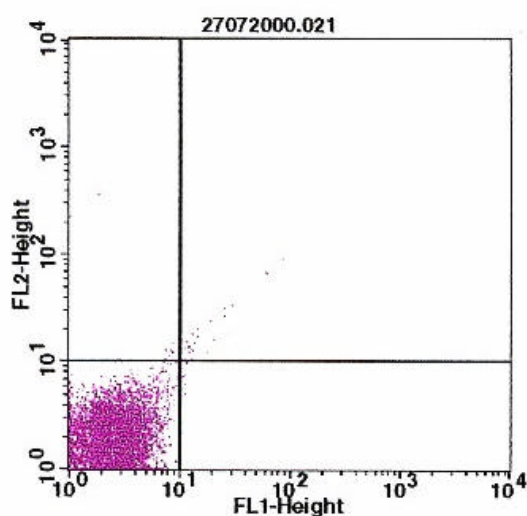


Gráfico 18 – População controle-negativo de linfócitos
Grupo A3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6734
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: TJ SET04
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	14	0.21	0.14	6.68	52.28
UR	23	0.34	0.23	23.53	24.81
LL	6690	99.35	66.90	2.75	2.22
LR	7	0.10	0.07	10.92	7.37

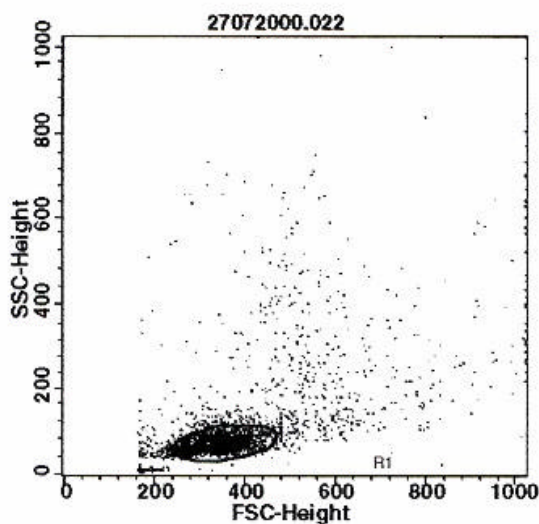


Gráfico 19 – Gate controle de linfócitos CD4
Grupo A3

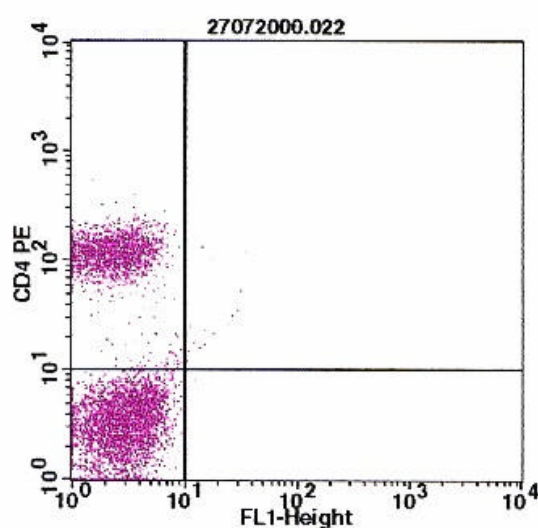


Gráfico 20 – População de linfócitos CD4
Grupo A3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6639
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: TJ SET04
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD4 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	2232	33.62	22.32	2.67	118.35
UR	22	0.33	0.22	17.38	43.24
LL	4383	66.02	43.83	3.13	3.53
LR	2	0.03	0.02	11.35	5.48

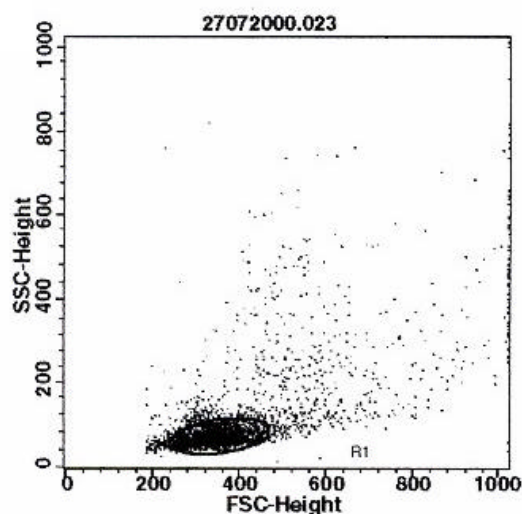


Gráfico 21 – Gate controle de linfócitos CD8
Grupo A3

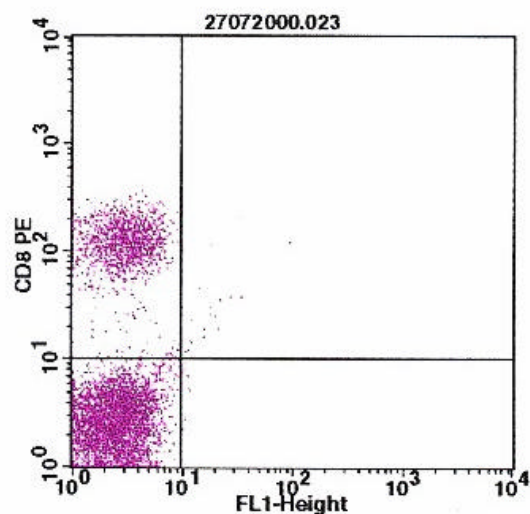


Gráfico 22 – População de linfócitos CD8
Grupo A3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 7037
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: TJ SET04
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD8 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1667	23.69	16.67	3.27	129.70
UR	22	0.31	0.22	21.09	43.54
LL	5339	75.87	53.39	2.68	2.91
LR	9	0.13	0.09	10.58	6.26

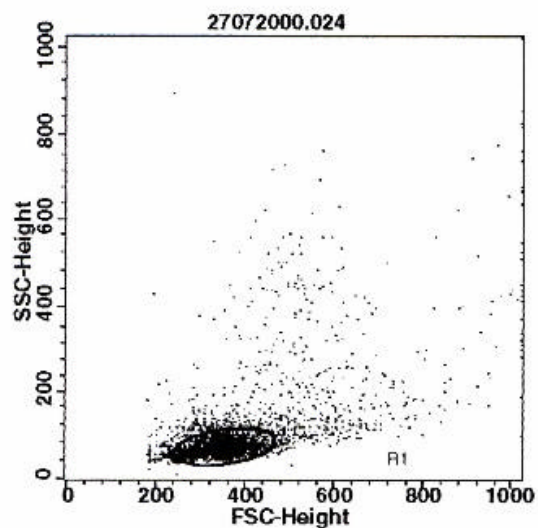


Gráfico 23 – Gate controle de linfócitos CD45RB
Grupo A3

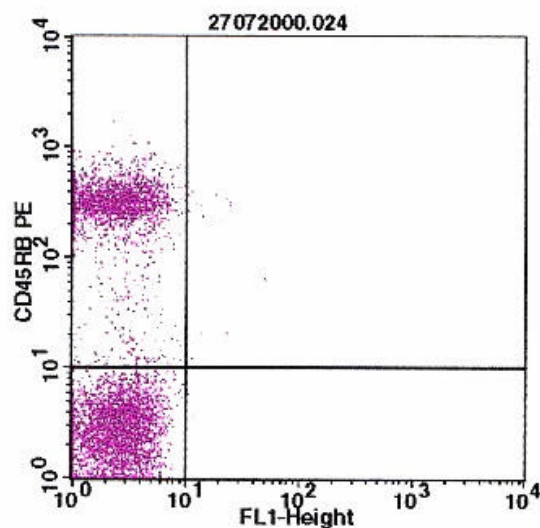


Gráfico 24 – População de linfócitos CD45RB
Grupo A3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 7103
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: TJ SET04
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD45RB PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	2877	40.50	28.77	2.72	316.02
UR	19	0.27	0.19	18.41	263.87
LL	4204	59.19	42.04	2.80	3.06
LR	3	0.04	0.03	11.47	6.44

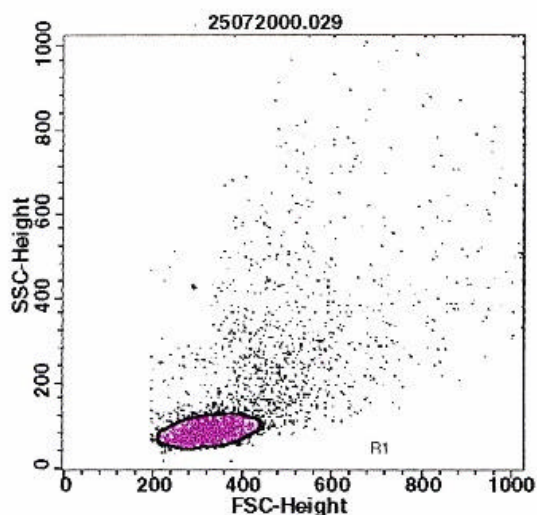


Gráfico 25 – Gate controle de células mononucleares
Grupo B1

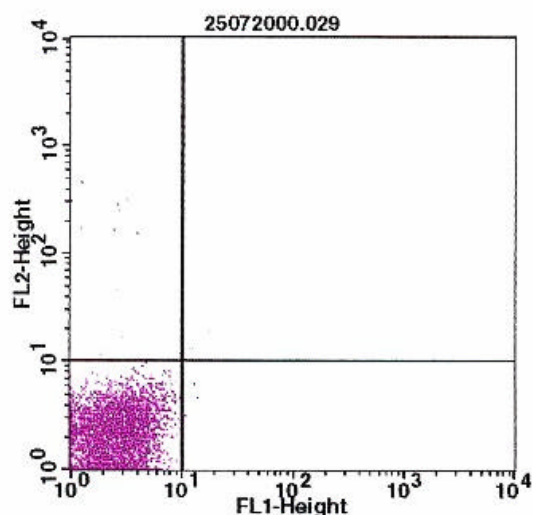


Gráfico 26 – População controle-negativo de linfócitos
Grupo B1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 5811
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: RX ENO5
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	15	0.26	0.15	3.22	166.73
UR	3	0.05	0.03	13.59	14.08
LL	5789	99.62	57.89	2.80	2.32
LR	4	0.07	0.04	12.11	4.19

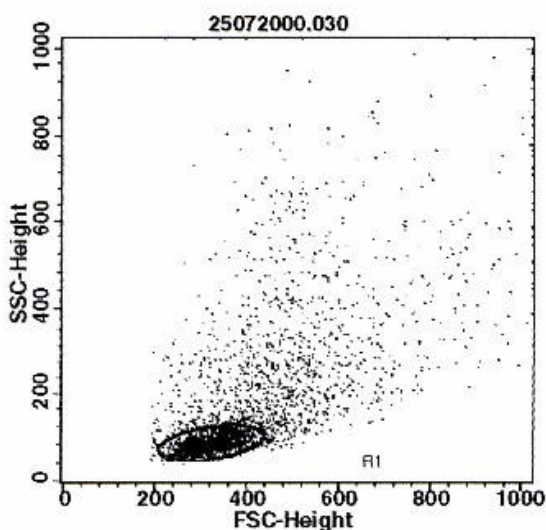


Gráfico 27 – Gate controle de linfócitos CD4
Grupo B1

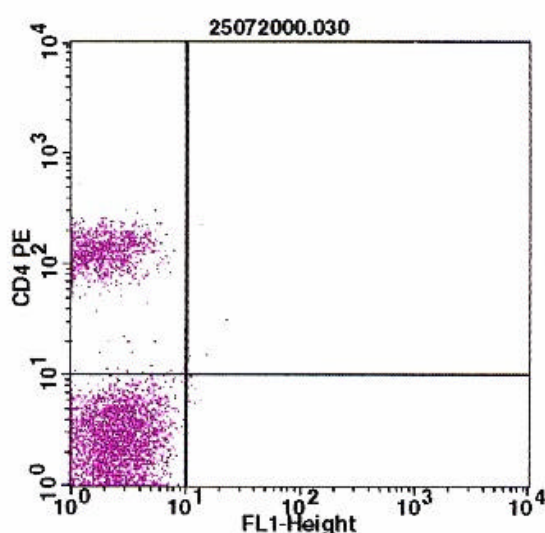


Gráfico 28 – População de linfócitos CD4
Grupo B1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 5551
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: RX ENO5
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD4 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1401	25.24	14.01	2.07	132.62
UR	6	0.11	0.06	13.93	50.57
LL	4135	74.49	41.35	2.81	2.83
LR	9	0.16	0.09	11.51	7.15

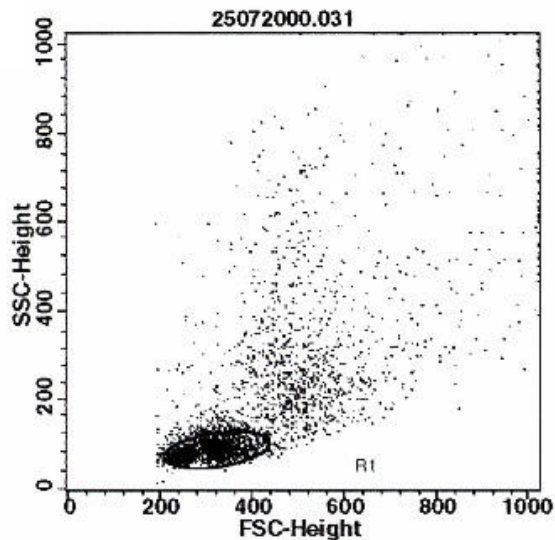


Gráfico 29 – Gate controle de linfócitos CD8
Grupo B1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 5322
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1044	19.62	10.44	2.86	213.97
UR	2	0.04	0.02	30.04	23.58
LL	4271	80.25	42.71	2.55	2.95
LR	5	0.09	0.05	11.97	7.96

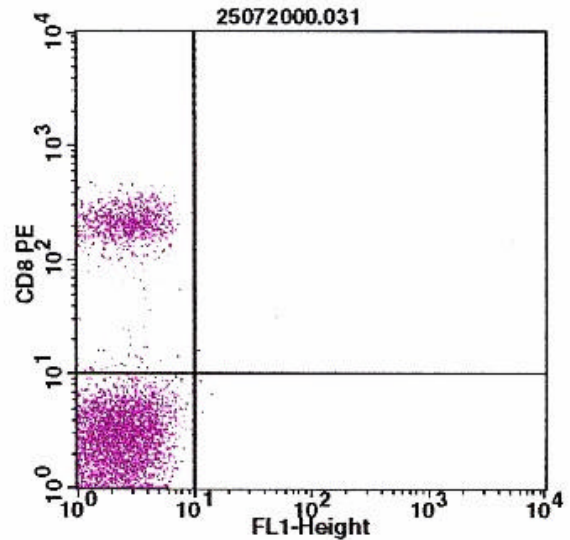


Gráfico 30 – População de linfócitos CD8
Grupo B1

Sample ID: RX EN05
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD8 PE (Log)

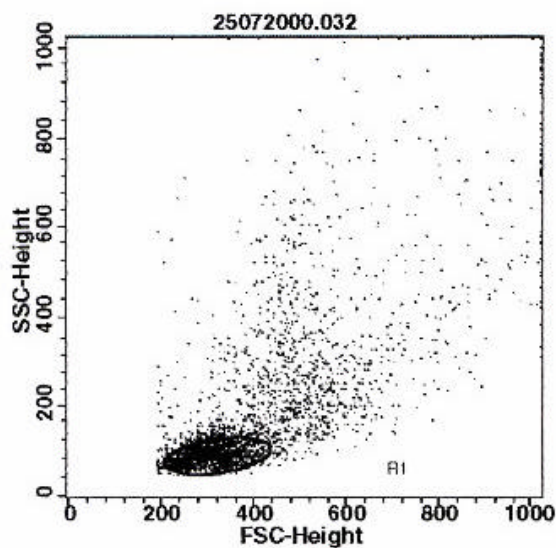


Gráfico 31 – Gate controle de linfócitos CD45RB
Grupo B1

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 5103
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	2706	53.03	27.06	2.59	351.01
UR	4	0.08	0.04	12.96	106.67
LL	2391	46.85	23.91	2.45	2.95
LR	2	0.04	0.02	10.91	9.26

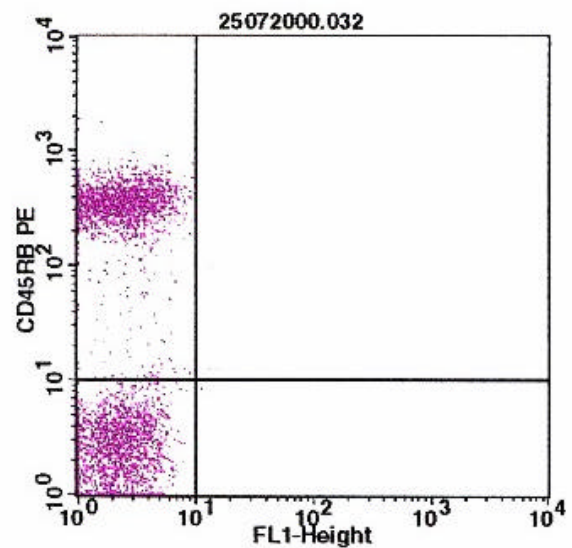


Gráfico 32 – População de linfócitos CD45RB
Grupo B1

Sample ID: RX EN05
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD45RB PE (Log)

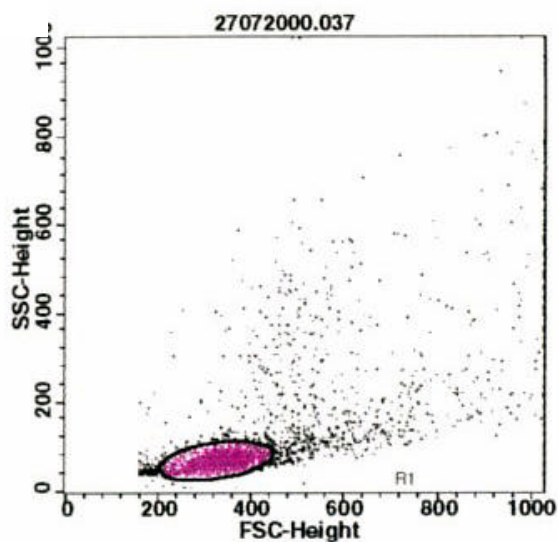


Gráfico 33 – Gate controle de células mononucleares
Grupo B2

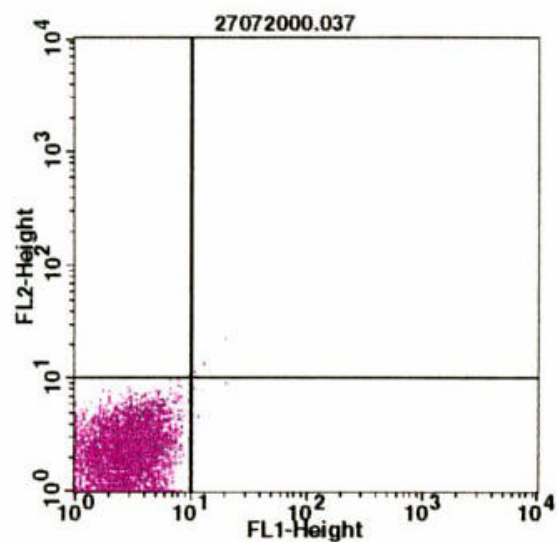


Gráfico 34 – População controle-negativo de linfócitos
Grupo B2

Log Data Units: Linear Values

Patient ID: EX VIVO BACO

Gated Events: 6658

X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: RX ERE09

Gate: G1

Total Events: 10000

Y Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1	0.02	0.01	7.23	13.34
UR	9	0.14	0.09	14.78	15.55
LL	6640	99.73	66.40	3.11	2.49
LR	8	0.12	0.08	12.12	6.20

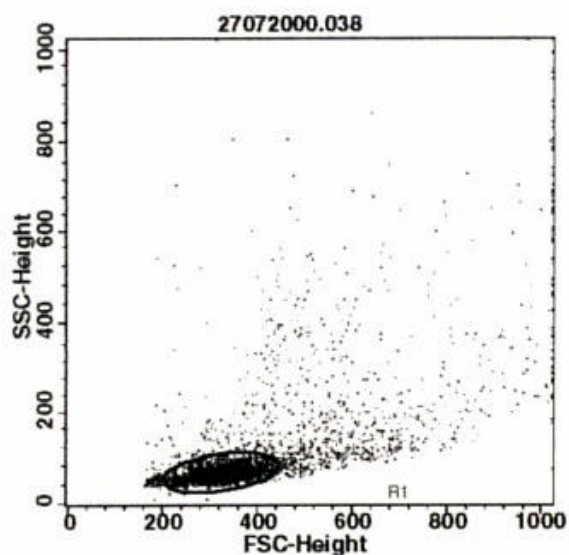


Gráfico 35 – Gate controle de linfócitos CD4
Grupo B2

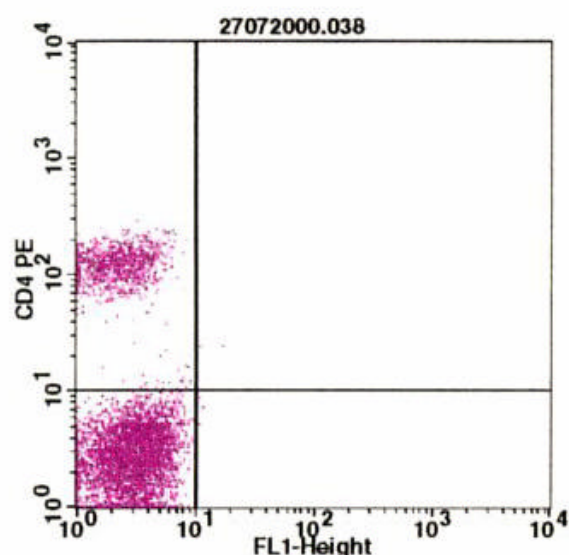


Gráfico 36 – População de linfócitos CD4
Grupo B2

Log Data Units: Linear Values

Patient ID: EX VIVO BACO

Gated Events: 6798

X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: RX ERE09

Gate: G1

Total Events: 10000

Y Parameter: FL2-H CD4 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1364	20.06	13.64	2.52	122.59
UR	4	0.06	0.04	13.27	19.47
LL	5425	79.80	54.25	3.19	3.05
LR	5	0.07	0.05	11.07	7.47

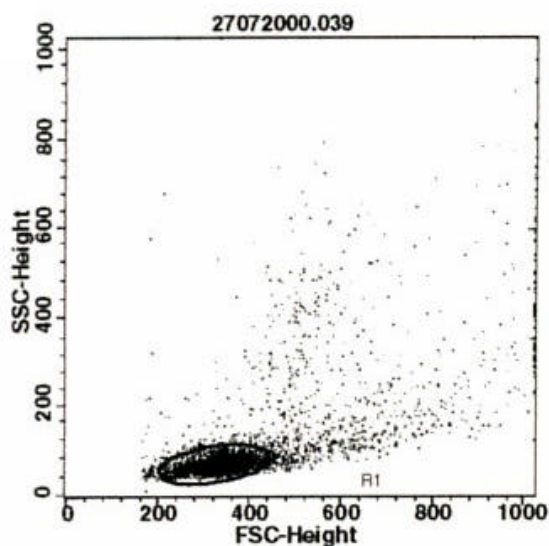


Gráfico 37 – Gate controle de linfócitos CD8
Grupo B2

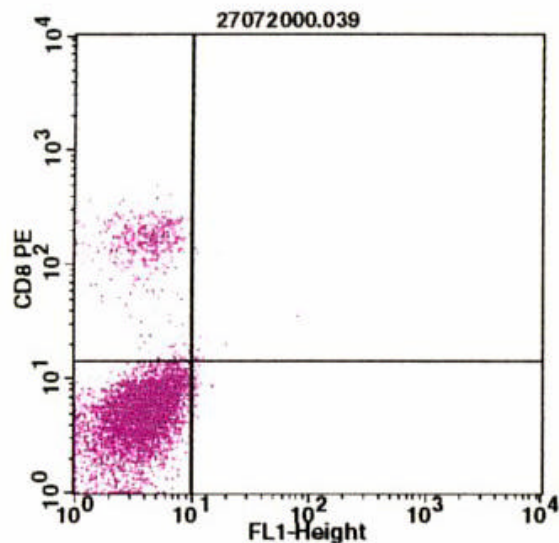


Gráfico 38 – População de linfócitos CD8
Grupo B2

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6622
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: RX ERE09
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD8 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	610	9.21	6.10	4.45	161.04
UR	16	0.24	0.16	16.71	51.24
LL	5965	90.08	59.65	4.15	5.41
LR	31	0.47	0.31	11.27	9.04

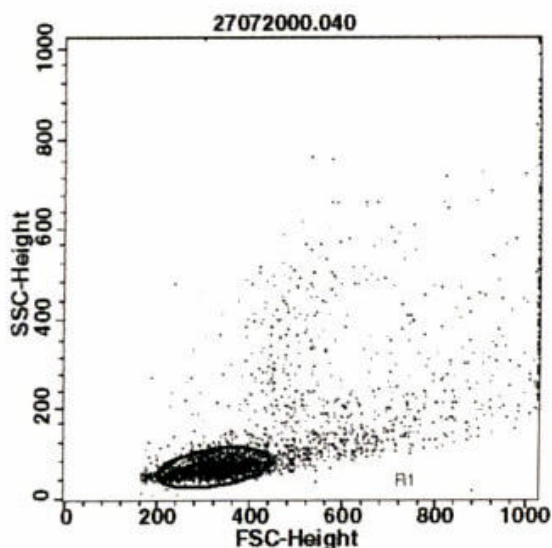


Gráfico 39 – Gate controle de linfócitos CD45RB
Grupo B2

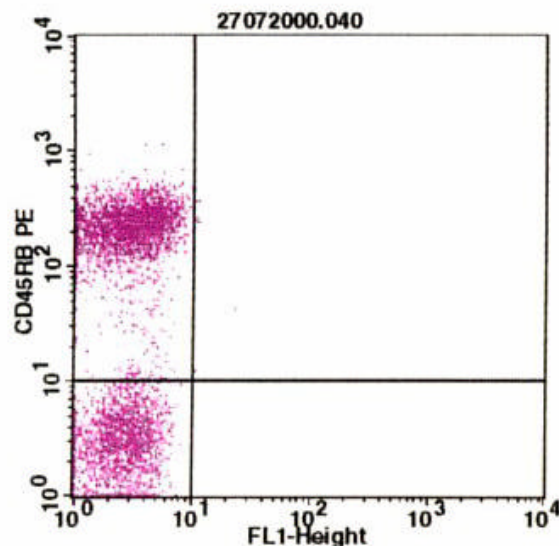


Gráfico 40 – População de linfócitos CD45RB
Grupo B2

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 6434
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: RX ERE09
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD45RB PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	4163	64.70	41.63	3.24	233.76
UR	12	0.19	0.12	11.78	189.66
LL	2258	35.09	22.58	2.82	3.38
LR	1	0.02	0.01	12.63	10.00

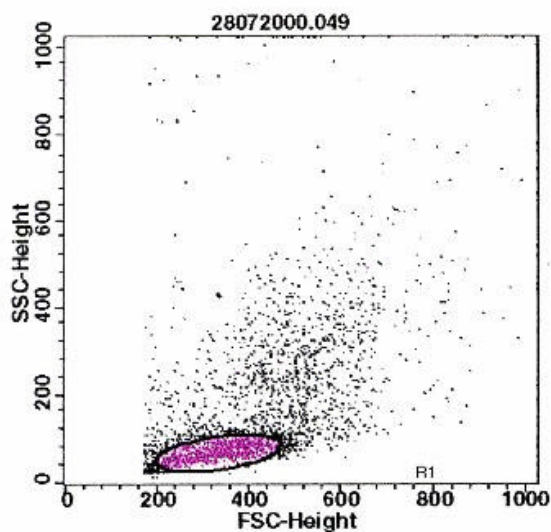


Gráfico 41 – Gate controle de células mononucleares
Grupo B3

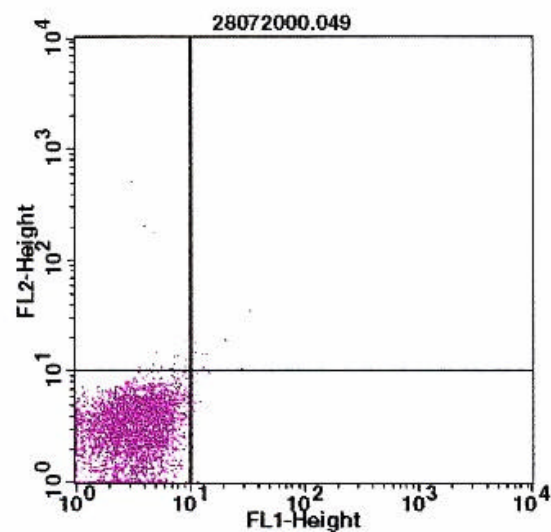


Gráfico 42 – População controle-negativo de linfócitos
Grupo B3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 4862
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: BR SET08
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	16	0.33	0.16	6.31	66.08
UR	10	0.21	0.10	16.78	16.32
LL	4816	99.05	48.16	3.61	3.34
LR	20	0.41	0.20	11.36	5.75

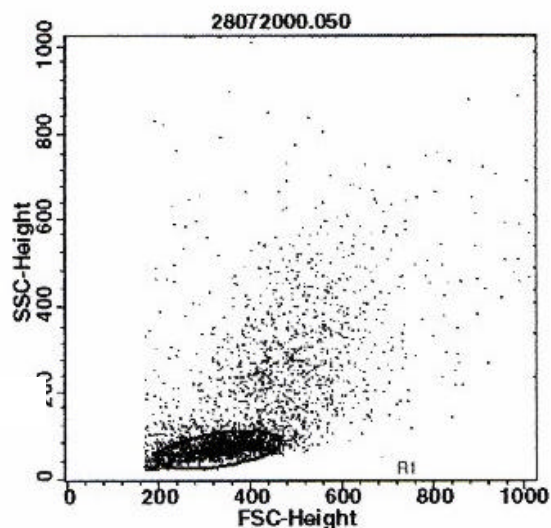


Gráfico 43 – Gate controle de linfócitos CD4
Grupo B3

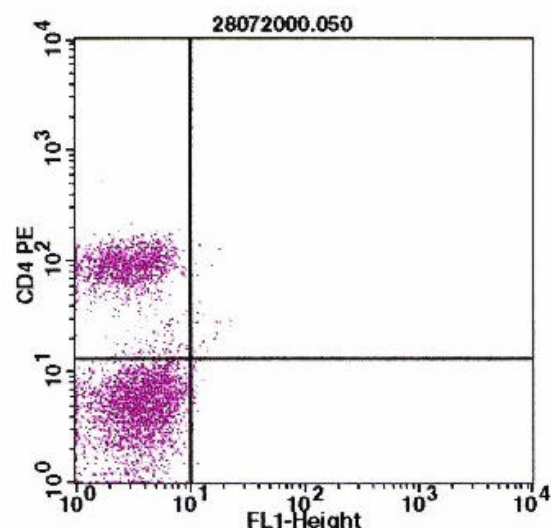


Gráfico 44 – População de linfócitos CD4
Grupo B3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 4935
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: BR SET08
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD4 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1700	34.45	17.00	3.28	88.92
UR	25	0.51	0.25	14.13	41.92
LL	3187	64.58	31.87	3.96	5.24
LR	23	0.47	0.23	11.06	7.01

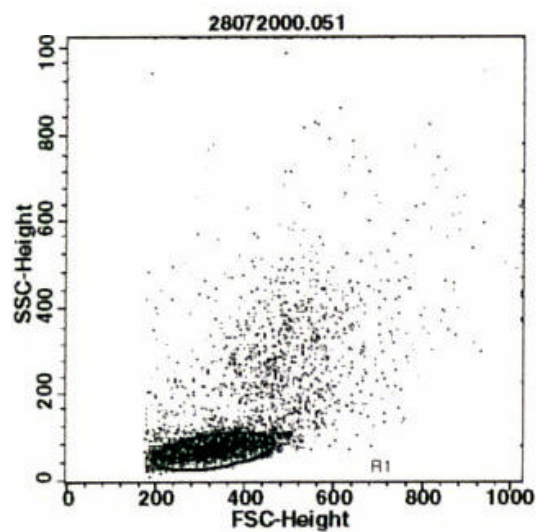


Gráfico 45 – Gate controle de linfócitos CD8
Grupo B3

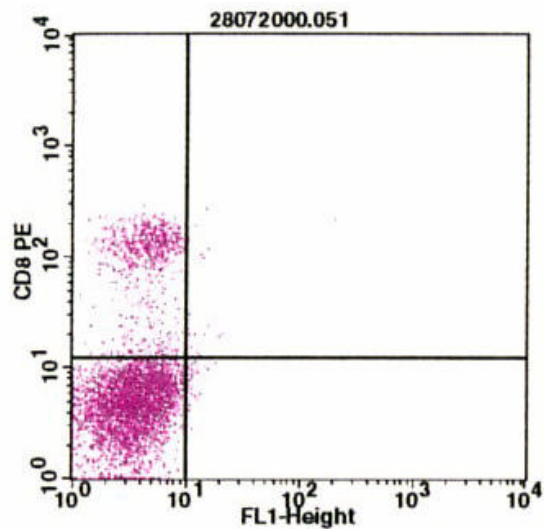


Gráfico 46 – População de linfócitos CD8
Grupo B3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 5054
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: BR SET08
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD8 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	886	17.53	8.86	4.67	108.59
UR	34	0.67	0.34	26.75	85.83
LL	4094	81.01	40.94	3.74	5.00
LR	40	0.79	0.40	12.09	7.97

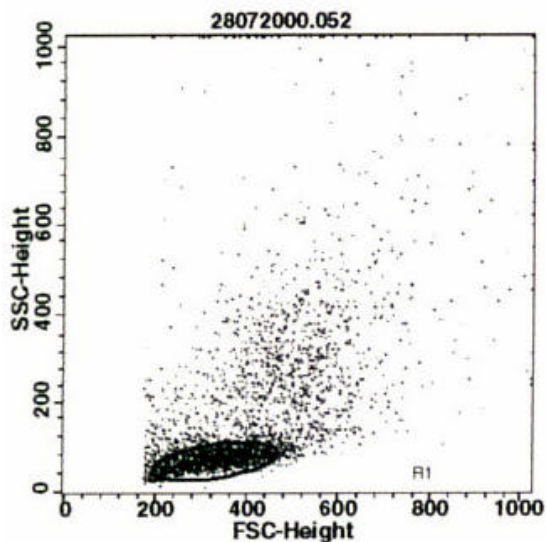


Gráfico 47 – Gate controle de linfócitos CD45RB
Grupo B3

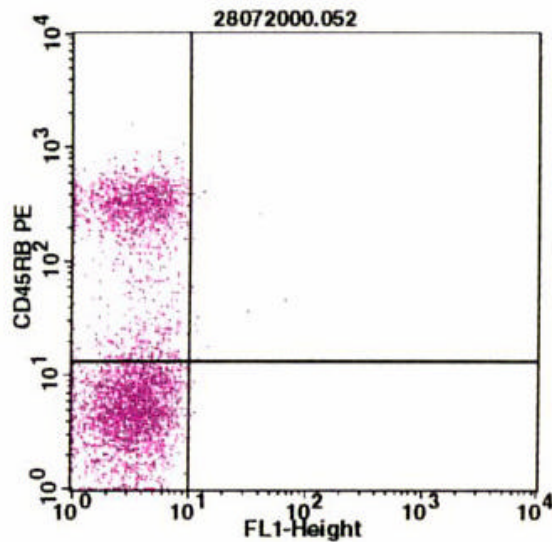


Gráfico 48 – População de linfócitos CD45RB
Grupo B3

Log Data Units: Linear Values
Patient ID: EX VIVO BACO
Gated Events: 4965
X Parameter: FL1-H FL1-Height (Log)

Sample ID: BR SET08
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: FL2-H CD45RB PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1826	36.78	18.26	4.03	277.58
UR	30	0.60	0.30	22.06	189.55
LL	3101	62.46	31.01	3.62	5.43
LR	8	0.16	0.08	11.36	7.91

4 - DISCUSSÃO

*"The whole spleen is better than part of the spleen,
and some spleen is better than none"*

J. Raymond Hinshaw

4.1 - Sobre o Objetivo do Estudo

São numerosas as publicações que discutem o assunto esquistossomose, incluindo estudos clínicos e também experimentais; entre outros temas de interesse, são analisados aspectos clínicos das várias formas de apresentação da doença e seu diagnóstico, além do padrão histológico de comprometimento do parênquima hepático e as respostas imunes dirigidas aos antígenos das diferentes formas evolutivas do parasito no hospedeiro definitivo (ANDRADE, et al., 1998; ARAÚJO et al, 1977; ARRUDA, et al., 1993; CARNEIRO-SANTOS et al., 2000; COELHO, 1971; GAZZINELLI et al., 1985; GUERRA et al., 1991; KATZ, 1999; LAMBERTUCCI et al., 1990, 1993, 1997, 1998; PELLEGRINO & MACEDO, 1955; TEIXEIRA et al., 1996).

Na área de Cirurgia, o objeto maior da discussão é direcionado à fase crônica da forma hépato-esplênica de esquistossomose, em sua maioria envolvendo estudos com pacientes portadores de hipertensão portal e hemorragia digestiva alta, investigando aspectos relacionados às diversas propostas de intervenções cirúrgicas para o tratamento dessa complicação, seus resultados e suas conseqüências (BRANDT et al., 1995; FERRAZ et al., 1982a, FERRAZ et al., 1982b; FERRAZ et al., 1991; KELNER et al., 1982; LACERDA et al., 2000; PETRIOANU et al., 1997; RAIA et al., 1991).

Em Pernambuco, KELNER et al. (1964) idealizaram abrangente programa de estudo relacionando esquistossomose, hipertensão portal, hemorragia por ruptura de varizes esofágicas ou do fundo gástrico e o tratamento cirúrgico dessa complicação da doença. No ano seguinte, KELNER (1965) apresentou a sua tese para assumir a cátedra de cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife. Tal linha de investigação estabeleceu-se como o carro-chefe para a criação do Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* em Cirurgia, o primeiro do Norte e Nordeste do país e origem das pesquisas que geraram teses e publicações, algumas delas apresentadas e referenciadas em periódicos de repercussão globalizada (SILVEIRA, 2001).

Paralelamente, tornou-se também alvo de interesse entre os cirurgiões de todo o mundo o estudo sobre os efeitos deletérios da esplenectomia, qualquer tivesse sido a sua indicação, sobre o perfil imunológico dos pacientes. Significativo número de artigos passaram a discutir a sepse fulminante pós-esplenectomia, com

base no marcante relato de 5 casos ocorridos em crianças com menos de 6 meses de idade, publicado por KING & SCHUMAKER, em 1952.

FERRAZ et al. (1979, 1980a, 1980b, 1982a, 1992b, 1991, 1992), da UFPE, elaboraram braço investigativo promovendo a interseção entre duas linhas de pesquisa ali conduzidas: infecção em cirurgia e tratamento cirúrgico da hemorragia digestiva da hipertensão portal esquistossomótica. Os seus estudos têm, ao longo do tempo, demonstrado uma maior susceptibilidade de pacientes esquistossomóticos esplenectomizados às infecções cirúrgicas. Fatores os mais variados têm sido responsabilizados para a interpretação do fenômeno observado.

Alternativas cirúrgicas de derivações porto-sistêmicas com ou sem preservação do baço foram historicamente propostas para o tratamento da hipertensão portal, aplicadas inicialmente para pacientes cirróticos, e logo em seguida estendidas para portadores de esquistossomose. Tais operações, que envolvem necessariamente anastomoses vasculares, requerem material apropriado, além de serem tática e tecnicamente complexas, o que pressupõe treinamento e habilitação do cirurgião e integração entre os membros da sua equipe. Ademais, pode levar pacientes esquistossomóticos, que em geral preservam boa função hepática, a desenvolverem encefalopatia, o que torna sua indicação questionável nessa doença (LACERDA et al., 2002; ROCHA, 1997).

As desvascularizações (ou desconexões) do território venoso entre os sistemas ázigo e porta, sítio responsável pela hemorragia digestiva alta por ruptura de varizes, propõem a "esqueletização" da grande e da pequena curvaturas gástricas e do esôfago terminal, além de diferentes procedimentos complementares diretos sobre as varizes; a esplenectomia sempre é praticada nesses procedimentos (CAPUA Jr., CARNEIRO, JL & ROCHA, 1997).

São verificadas variações em aspectos de técnica operatória entre o grupo da UFPE, porém a remoção do baço sempre foi objeto de intensa consideração em todos os momentos. Ao longo dos anos, tornou-se claro o entendimento entre os pesquisadores do grupo quanto ao valor da esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (ELGE) em reduzir a pressão no sistema venoso portal, especialmente na "zona vulnerável" (KELNER & SILVEIRA, 1997) resultando no controle emergencial ou eletivo, a curto e médio prazos, do sangramento das varizes esofágicas de origem esquistossomótica. O racional da proposta consiste na simplicidade da operação quando comparada às derivações porto-sistêmicas ou às

desconexões ázigo-portais, que exigem intimidade da equipe cirúrgica com os procedimentos, de difícil execução e ensinamento, tornando-os de pouca praticidade em condições de urgência (LACERDA et al., 2002).

A compreensão de que o acometimento hepatocelular e o mecanismo fisiopatológico da manifestação hemorrágica da hipertensão portal são diversos quando comparadas as doenças cirrose e esquistossomose, e que tal fato implicava em diferentes resultados observados nas operações executadas é considerada, por estudiosos de todo o mundo, uma valiosa contribuição do grupo da UFPE ao conhecimento médico, especialmente entre cirurgiões de escolas interessadas no assunto (LACERDA et al., 2002; RAIA, 1997).

Desde o trabalho de KING & SCHUMAKER (1952), têm sido igualmente numerosas as publicações sobre esplenectomia, cirurgia conservadora do baço e autoimplante de tecido esplênico, variando desde estudos com modelos animais analisando aspectos imunológicos e de resposta à agressão infecciosa, a estudos clínicos em que o método foi empregado em pacientes vítimas de traumatismos abdominais com lesões extensas do pedículo vascular ou do parênquima esplênicos, nos portadores de hipertensão portal esquistossomótica ou de doenças hemolinfopoiéticas, obrigando à remoção cirúrgica parcial ou total do órgão (MARQUES & PETROIANU, 2003).

O real desenvolvimento da cirurgia conservadora do baço no trauma teve origem no Brasil, com o pioneiro trabalho de CAMPOS-CHRISTO (1959, 1962), de Minas Gerais, fundamentado nos estudos da anatomia esplênica de ZAPPALÁ (1958, 1959), e cujo resultado estimulou o surgimento de um elevado número de propostas cirúrgicas alternativas para a preservação do baço, especialmente naqueles sede de traumatismo severo, com sistematização da técnica operatória para a mobilização, luxação e exposição do órgão, para a execução de suturas e outras opções técnicas, a fim de coibir o sangramento (MORGENSTERN & SHAPIRO, 1979).

Autores têm proposto técnicas de preservação do máximo possível de tecido esplênico vascularizado do baço em traumas, na β -talassemia e em várias outras doenças do sistema hemolinfopoiético. PETROIANU (1993a), da UFMG, defende como alternativa a esplenectomia parcial, ou seja, a preservação do pólo superior do órgão, seja em situações emergenciais de trauma, na cirurgia eletiva da hipertensão portal de origem esquistossomótica e também em doenças hematológicas.

Não são isoladas, entretanto, as descrições de complicações hemorrágicas no pós-operatório imediato de procedimentos sobre o baço, com relatos de relaparotomias e até de óbitos entre os pacientes assim conduzidos, tendo como explicação a natureza compacta e intensamente vascularizada do órgão; a dor pós-operatória, com a conseqüente elevação dos níveis pressóricos, favoreceriam o retorno do sangramento no sítio operado após a síntese da parede abdominal, por vezes estando o paciente já na sala de recuperação pós-anestésica (ADEODATO, 1991; ADEODATO & FERRAZ, 1992; ELLISON & FABRI, 1984; MORGENSTERN & SHAPIRO, 1979; LACERDA et al., 2002; RABELO et al., 1991).

Nos últimos anos, uma linha de pesquisa passou a ser desenvolvida no Serviço de Cirurgia Pediátrica do HC-UFPE, tendo como objeto central da investigação um grupo de crianças esquistossomóticas com história de episódios de hemorragia digestiva alta por varizes sangrantes do esôfago, e submetidas eletivamente a esplenectomia, nas quais é realizado, no mesmo ato operatório, o auto implante de fragmentos de baço no grande omento. As avaliações da função do enxerto são realizadas com base em componentes do sangue dos pacientes operados, e a sua viabilidade vascular pela cintilografia com hemácias marcadas, ou seja, não há análise do tecido implantado em si. Diferentes temas têm sido alvo dessa investigação, destacando-se para análise no contexto desta tese aqueles relacionados aos aspectos das alterações imunológicas observadas (BRANDT et al., 1995, 1996, 1997, 1998a, 1998b, 1998c, 2001).

Independentemente da instituição em que estão sendo conduzidas, pesquisas sobre a função imunológica do tecido esplênico autoimplantado foram subdivididas em diferentes modelos e métodos de estudo; vários desses estudos investigam aspectos diversos da imunidade, quase sempre através da dosagem sanguínea de componentes séricos do sistema imune.

O modelo animal aqui proposto ofereceu oportunidade para o estudo do próprio tecido esplênico enxertado no grande omento de camundongos saudáveis e esquistossomóticos, comparando-os a baços íntegros e remanescentes vascularizados do órgão. Isso permitiu a aferição da regeneração histológica e, principalmente, do restabelecimento das subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB, medidas pela citometria de fluxo.

Diferenças fundamentais entre as espécies limitam a interpretação dos resultados aqui observados em camundongos, para a inferência dos fenômenos

observados no homem. Porém, é consistente como uma referência a ser considerada, pois a obtenção de material em humanos submetidos ao autoimplante de fragmentos de baço envolve claras dificuldades técnicas e éticas.

A contribuição aqui apresentada, portanto, foi oferecer aos pesquisadores a opção de um modelo experimental de estudo que permita a obtenção de material para análise, no que se refere à viabilidade não apenas estrutural como também funcional do tecido esplênico autoimplantado, antes acessível apenas através de métodos indiretos, sejam eles exames hematimétricos ou de imagem.

4.2 - Sobre o Modelo Animal

Os princípios da experimentação científica em animais devem obedecer critérios éticos, conhecidos entre os pesquisadores de língua inglesa como os três "Rs", ou seja, *replacement*, *refinement* e *reduction*, que são respectivamente interpretados como: **substituição** de métodos que requeiram o sacrifício de animais por métodos alternativos passíveis de realização que consigam estudar as mesmas observações propostas; **refinamento**, ou disponibilização e domínio de recursos metodológicos de investigação que, baseados em um planejamento reflexivo e criterioso, permitam ao pesquisador otimizar o seu trabalho em função do modelo concebido; e **redução** do número de animais necessários ao objetivo do experimento, sem comprometimento de suas observações, através da formulação de técnicas de manuseio dos mesmos, tendo como base o respeito à vida, visando infligir o mínimo de dor e sofrimento aos animais (PETROIANU, 2001).

Contudo, exageros protecionistas aos animais de experimentação, oriundos especialmente de membros de organizações não-governamentais, "... e de sociedades de ambientalistas histéricos que sobrevivem às custas da fabricação de escândalos... e insurgem-se contra instituições e pesquisadores sérios...", têm sido denunciados por especialistas no assunto, que alertam a comunidade científica brasileira para a necessidade de despertar o interesse, acompanhar e supervisionar a revisão da nova regulamentação ética do projeto de lei que entrará brevemente em tramitação no Congresso Nacional (CÂMARA & COELHO, 2003).

Vantagens e desvantagens têm que ser cuidadosamente consideradas durante todo o processo intelectual de formulação do projeto, de modo a reduzir as

variáveis indesejadas e fatores complicadores na fase de execução prática do experimento.

O porte dos animais é um aspecto relevante na concepção do modelo de experimentação, desde que este influencia na factibilidade técnica do procedimento cirúrgico proposto e na obtenção de material para processamento laboratorial; pequenos animais se tornam modelos inadequados quando a necessidade de volume do material biológico é maior. Cães e porcos são empregados, devido ao seu maior porte, em estudos que investigam preferencialmente a anatomia vascular do baço.

PETROIANU (1993a) realizou experimentos em diferentes espécies de animais, até mesmo incluindo aqueles de médio porte, porém o interesse maior do seu trabalho recai sobre a proposta de preservação do polo superior do baço, irrigado pelos vasos curtos.

No presente estudo, o pólo superior preservado *in situ* foi denominado remanescente esplênico e ofereceu para estudo aproximadamente um terço da massa de tecido esplênico comparado ao baço íntegro, e também, naturalmente vascularizado. Desse modo, os dois grupos de animais assim operados apresentaram-se como controle para os grupos de camundongos submetidos à enxertia.

Pesquisas experimentais sobre a regeneração de enxertos do tecido esplênico foram, em sua maioria, realizados em ratos ou camundongos; modelos utilizando coelhos, cães e outros animais são menos freqüentes.

Esses estudos comprovam que, em roedores, a massa total de tecido resgatado também corresponde, em média, a cerca de um terço do total implantado, devido à necrose parenquimatosa das camadas mais centrais até a completa neoformação vascular (ALVES et al, 1999; MARTINS-TORRES et al 1994; RODRIGUES et al., 1991; TAVASSOLI et al, 1973; VEGA et al, 1981).

O maior porte do animal interfere de modo linear e direto nas dificuldades relacionadas às condições de cativeiro, consumo de material e tempo de experimentação. Animais de menor porte geralmente se reproduzem em maior velocidade, destacando-se entre esses os roedores, o que confere ao biotério de criação oportunidade mais breve de planejamento qualitativo e quantitativo na reposição da população de cobaias.

Roedores têm sido utilizados em pesquisas experimentais que investigam tanto a esplenectomia como a regeneração e a função de implantes de tecido esplênico, além da influência desses procedimentos diante da exposição dos animais a cargas contaminantes de bactérias, inoculadas intravenosamente, intraperitonalmente ou através da inalação de aerossóis contendo microorganismos (ALWMARK et al., 1981; DICKERMAN et al., 1979; HEBERT et al., 1983; LIKHITE, 1975; PATEL et al., 1982; SCHWARTZ et al., 1978).

Considerando as diretrizes acima colocadas e sendo de porte aproximadamente 10 vezes maior do que os camundongos, em tese, os ratos forneceriam melhores condições de operabilidade e obtenção de maior volume de material para o processamento das técnicas laboratoriais necessárias à execução deste projeto.

Entretanto, devido à sua resistência às infecções parasitárias, são animais impróprios para o estudo da esquistossomose. O rato, de acordo com as características imunológicas desenvolvidas ao longo do tempo pela espécie, é um animal reconhecidamente resistente a infecções, sejam elas induzidas por microorganismos ou parasitos (ANDRADE & CHEEVER, 1993; ANDRADE et al., 1998; ARAÚJO et al., 1977; ARRUDA et al., 1993).

Camundongos são animais experimentais de pequeno porte, o que permite a utilização de um maior número de animais, além de uma manutenção mais fácil no cativeiro, resultando em um custo financeiro reduzido durante a pesquisa. Apesar de ser possível a manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni* em diferentes animais de laboratório, o camundongo apresenta as características mais apropriadas para tal (ANDRADE & CHEEVER, 1993; FERRAZ et al., 1993; TEIXEIRA, 1997).

Por outro lado, o pequeno volume corporal do animal dificulta o seu manuseio em relação a diferentes procedimentos mais delicados devido às diminutas dimensões dos órgãos, tornando-os mais susceptíveis a erros técnicos que podem resultar na morte. A obtenção de material para estudos complementares de qualquer ordem, como hematológicos, bioquímicos, histológicos e outros, torna-se tarefa de difícil execução.

Neste estudo, além das características citadas acima de forma universal, o modelo em camundongos foi apropriado por constituir-se no principal animal hospedeiro definitivo para a manutenção do ciclo evolutivo do esquistossomo no biotério do GIDE (PELEGRINO & MACEDO, 1955).

Garantir a qualidade para a realização de estudos experimentais com aumento da fidedignidade dos resultados observados depende ainda da linhagem genética dos animais; sabe-se que cobaias oriundas de cepas isogênicas oferecem maior garantia da não-interferência de variáveis indesejadas. Biotérios de criação de linhagens isogênicas de animais de experimentação são estruturas complexas, de manutenção complicada e de custo elevado, o que inviabiliza economicamente a sua disponibilidade para a imensa maioria das universidades brasileiras.

Mesmo obedecendo os princípios da experimentação em animais e apesar de todos os cuidados pré, trans e pós-operatórios, a mortalidade estimada é de aproximadamente 20% entre os animais sadios e de até 30% entre os animais esquistossomóticos submetidos a essas operações, conforme verificado em nossos estudos pilotos anteriores, nas mesmas condições descritas no presente trabalho. Sem dúvida a infecção pelo parasito espolia o animal, reduzindo sua resistência e capacidade de sobrevivência.

Os camundongos deste estudo foram tratados, sob o ponto de vista de condições de biotério, de modo individualizado e sistematizado até o seu sacrifício. Ainda assim, a mortalidade pós-operatória foi considerável (13% entre animais sadios e 22% entre esquistossomóticos), algo menor do que o esperado; não houve comprometimento, entretanto, do número de animais à disposição para a pesquisa.

4.3 - Definição de Termos e Aspectos Histológicos

Apesar de diferentes termos serem aplicados ao procedimento, que consiste na colocação cirúrgica de tecido esplênico em diferentes locais de determinado organismo, é importante e conveniente considerar a discussão sobre eventuais diferenças entre eles, procurando unificar uma linguagem, melhor definindo-a, no que se refere ao baço removido (ou porções dele) do seu sítio original, e reposicionado.

Dentre os grupos que pesquisam e publicam mais regularmente sobre o assunto, percebe-se a utilização de termos diversos, para descrever a mesma técnica operatória. Pelo grupo da Cirurgia Pediátrica do HC-UFPE, já foram empregados, por exemplo, os seguintes termos: **esplenose** (BRANDT & MACIEL, 1993; BRANDT et al., 1996, 1998a), **autologous splenic transplantation** (BRANDT et al., 1995), **auto-implante** (BRANDT et al., 1997, 1998b), **autotransplantation**

(BRANDT et al., 1998c) e **autotransplant** e **splerosis** (BRANDT et al., 2001). Percebe-se o mesmo nos artigos de PATEL et al.: **autotransplantation** (1981), **implantation** (1982) e **reimplantation** (1986).

Há muito se conhece sobre a capacidade de regeneração espontânea do tecido esplênico na cavidade abdominal; casos de esplenose extra-abdominal também foram relatados (MARQUES & PETROIANU, 2003).

O termo **esplenose**, entretanto, conforme proposto por BUCHBINDER & LIPKOFF, em 1939, foi definido como o implante espontâneo de células esplênicas secundário à ruptura traumática do baço; apresentaram um novo caso, revisaram 10 casos da literatura e afirmaram: “o grande número, a localização difusa incomum para baços acessórios e a história de trauma severo ao baço, levou-nos a acreditar que esses nódulos não são baços acessórios mas sim implantes esplênicos definidos...nós oferecemos o termo **esplenose** para descrever essa condição”.

Na literatura, alguns autores têm empregado adequadamente o termo, considerando o autoimplante **acidental** de esplenócitos na cavidade abdominal, e cujo uso deveria ser restrito aos humanos, já que não se encontram na literatura artigos que sugiram modelo animal de indução de trauma esplênico.

FLEMING et al. (1976) descreveram 3 casos de **esplenose** (os autores descreveram o fenômeno como a **autotransplantação** de tecido esplênico) em pacientes anteriormente esplenectomizados, todos com manifestações clínicas, cuja evolução desfavorável levou à necessidade de retirada cirúrgica do tecido esplênico heterotópico: um caso de torção do pedículo vascular do implante, um de Síndrome de Felty recorrente pós-esplenectomia e um achado incidental de uma laparotomia por obstrução intestinal, não motivada pelo tecido esplênico.

PEARSON et al. (1978) analisaram a ocorrência de **esplenose** em pacientes esplenectomizados através da verificação, no sangue periférico, do percentual de hemácias envelhecidas exibindo os chamados corpúsculos de Howell-Jolly, a fim de avaliar a função hemocaterética residual do tecido esplênico. Cinco deles, com percentuais normais desses corpúsculos, foram então submetidos a cintilografia com enxofre coloidal, que evidenciou a presença de múltiplos nódulos extra-hepáticos captantes do marcador.

ANNEXTON, em 1979, comentando sobre a relação entre **esplenose** e os métodos para detectar sua presença, afirmou que a cintilografia, que mede a função reticuloendotelial do baço, era um método mais sensível para a detecção de

implantes do que quaisquer exames hematológicos, já que a presença de nódulos esplênicos à cintilografia era, às vezes, acompanhada por alterações degenerativas das hemácias encontradas na asplenia.

RICE & JAMES (1980) relataram 2 casos de sepse fulminante em pacientes esplenectomizados, porém portadores de tecido esplênico heterotópico após trauma abdominal severo, comprovado por ocasião da autópsia.

A **esplenose** ocorre, com menor grau de intensidade, em pacientes esplenectomizados eletivamente por doenças hematológicas; porém parece acontecer em grande número dos esplenectomizados por trauma, em consequência da ruptura da cápsula, o que parece explicar a menor incidência de sepse fulminante pós-esplenectomia neste 2º grupo de pacientes (PEARSON et al., 1978).

Apesar de ser comprovada, nesses fragmentos, a regeneração da estrutura histológica similar à do baço íntegro, não há, na **esplenose**, a **intenção** de se obter o resultado observado.

Assim, o termo **esplenose**, conforme concebido, não parece adequado para descrever a colocação **intencional** de fatias do baço retirado cirurgicamente na cavidade abdominal; não é apropriado e, portanto, não é empregado como sinônimo de enxerto ou autoimplante neste trabalho; optou-se aqui por manter caracterizada a definição histórica do mesmo como fenômeno de natureza **acidental**.

Os termos **transplant ou implant** da língua inglesa oriundos da mesma raiz latina (**trans plant ou im plant**), são ambos traduzidos no Dicionário Webster (não consta o termo **reimplant**) como sinônimos de **enxerto**, e assim considerados especificamente como terminologia da área médica; parece apropriada, então, a utilização de todos eles como tal, naquela língua.

São muitas as publicações em Inglês que utilizam os termos correlatos **transplantação, transplante** (ALVAREZ et al., 1987; ALVES et al., 1999; DICKERMAN et al., 1979; LEEMANS et al., 1999a, 1999b; LIKHTE, 1975; MARTINS-TORRES et al., 1994; PEGG & NORMAN, 1971; SZENDROI et al., 1993; TAVASSOLI et al., 1973; WESTERMANN et al., 1988, 1992; ZOLI et al., 1994) e **implante** (COONEY et al., 1979; MILLIKAN et al., 1982) como sinônimos.

Na língua portuguesa, no entanto, parece ser mais adequado empregar os termos **enxerto** ou **implante** para a técnica usualmente descrita para a regeneração de fragmentos de tecido esplênico. É pertinente ponderar que o prefixo latino **trans** pode referir-se apenas a situações em que são necessárias **anastomoses**

vasculares entre o **enxerto** (ou **implante**) e o receptor, se o pedículo vascular do órgão for comparado à **raiz** de uma planta, por onde ambos recebem a sua **nutrição**. É o que acontece nos transplantes de coração, fígado e rins, citando os mais freqüentes.

Estabelecendo um paralelo semântico, os termos dele derivados, portanto, seriam considerados mais adequados para descrever definir o **plantio** (mudas com raízes) de algo, e não propriamente uma **semeadura** (sementes). Desse modo, na **enxertia** ou **implantação**, subentende-se que os fragmentos não possuam vasos (ou raízes). Na área da cirurgia plástica reconstrutora, emprega-se o termo **retalho** para tecidos doadores vascularizados e **enxerto** para aqueles privados da sua irrigação sangüínea natural.

Noutra conotação, entende-se por **transplante** a transferência de material biológico (órgão ou tecido), originário de um indivíduo, para outro indivíduo; ou de um sítio original para um sítio à distância, no mesmo organismo. O prefixo, neste caso, refere-se ao destino do material, que não mais permanecerá no seu local de origem. Nesse contexto único, o termo **transplante** (ainda que não sejam efetuadas anastomoses vasculares), poderia ser empregado para descrever a técnica de regeneração aqui utilizada, assim como é utilizado para descrever a transferência de córnea entre o doador e o receptor.

Outras definições são encontradas na discussão sobre o assunto, referindo-se à origem e destino do material biológico: o termo **autólogo** (ou **autógeno**) (RODRIGUES et al., 1991; SZENDROI et al., 1993) que significa oriundo do próprio organismo (o doador é também o receptor), se contrapõe ao termo **heterólogo**, em que o tecido é transferido de um indivíduo para outro; isso gera a diferença entre o **autotransplante** e o **alotransplante** (ou **transplante heterólogo**), respectivamente. Em relação ao tecido esplênico, o **alotransplante** de baço íntegro foi proposto em situações muito especiais (LIU et al., 1995).

Quanto ao local definitivo de implantação do órgão ou tecido em relação à sua localização original, pode-se distinguir o termo **ortotópico** (no mesmo local) do termo **heterotópico** (em sítio distinto) (TAVASSOLI et al., 1973).

Desta forma, explica-se o emprego dos termos que definem com maior precisão a técnica de implante de tecido esplênico utilizada nesse experimento: **autoimplante** ou **enxerto autólogo heterotópico**.

Merece ser destacada a importante contribuição do mineiro CAMPOS-CHRISTO (1959, 1962), que, com base nos estudos anatômicos da vascularização lienal realizados por seu conterrâneo e contemporâneo ZAPALÁ (1958,1959), realizou e divulgou os primeiros casos da cirurgia conservadora do baço traumatizado. Segundo McCLUSKY et al. (1999a, 1999b), o trabalho pioneiro do brasileiro constitui-se em um marco histórico da cirurgia esplênica. Os artigos de CAMPOS-CHRISTO tornaram-se referência quase obrigatória nas revisões sobre o assunto, e é, certamente, um dos brasileiros mais citados na literatura pertinente.

Com relação ao remanescente esplênico vascularizado, autores têm utilizado diferentes expressões para descrever uma mesma intervenção cirúrgica, que consiste na manutenção do polo superior do baço nutrido apenas pela *vasa brevia*, ou vasos esplenogástricos ou vasos curtos: **esplenectomia segmentar** (KAMEL et al., 1986); **esplenectomia parcial** (AL-SALEM et al. 1997; COONEY et al., 1979; 1997; FREUD et al., 1997; IDOWU & HAYES-JORDAN, 1998; KIMBER et al., 1998); **hemiesplenectomia** (HORTON et al., 1982); ressecção parcial (MILLIKAN et al., 1982); e **esplenectomia subtotal** (PETROIANU, 1993a).

Independente da denominação conferida ao ato operatório, o tecido esplênico restante (pólo superior), apesar de possuir menor volume (aproximadamente um terço do baço intacto), mantém uma característica primordial: em nenhum momento a estrutura é privada da sua circulação. PETROIANU (1993a) **denominou remanescente esplênico vascularizado** a este "baço residual", termo que foi adotado neste estudo.

O remanescente esplênico é aqui apresentado como um grupo controle de grande relevância, pois se assemelha aos outros grupos - baços íntegros e enxerto total, através de diferentes características, respectivamente: menor volume, vascularização mantida; e mesmo volume, desvascularizado.

À microscopia, o remanescente esplênico vascularizado apresentou-se estruturalmente idêntico ao baço íntegro, seja em animais sadios ou esquistossomóticos. Esta observação corrobora a afirmação de que a preservação da vasculatura original do órgão é um fator relevante na manutenção da função esplênica, quando a massa tecidual é reduzida. O exame mais detalhado de cortes histológicos do bordo seccionado do remanescente esplênico, e, portanto, área cruenta que também sofreu processo de cicatrização, apresentava espessamento fibroso da cápsula esplênica neoformada.

A mera presença de tecido esplênico macroscopicamente viável pode não garantir a função esplênica na prevenção da sepse fulminante; o uso de medidas como a vacina antipneumococos e a antibioticoprofilaxia prolongada com penicilina devem sempre ser recomendadas quando a retirada do baço torna-se imprescindível, até que os fragmentos de baço autoimplantados tenham atingido sua completa regeneração (COONEY, et al., 1979; DAJEE et al., 1982; RICE & JAMES, 1980).

Vários estudos perguntam qual a quantidade de tecido esplênico a ser implantado que seria necessária para manter a função esplênica e fagocitar microorganismos invasivos (LIKHTE, 1975; STEELY et al., 1988; VAN WICK et al., 1980; VEGA et al., 1981).

O peso do baço é proporcional ao peso do animal; ficou comprovado que há uma relação linear entre o volume do fragmento implantado e o volume recuperado, em implantes com até 100 mg; acima desse peso, a necrose do centro do enxerto é proporcionalmente maior do que a sua regeneração, que acontece, portanto, em direção centrípeta (TAVASSOLI et al., 1973; ALVES et al., 1999).

A eficiência dos enxertos esplênicos como suficientes para preservar a função imune (MOORE et al, 1984; RICE & JAMES, 1980; SCHWARTZ et al., 1978) tem sido motivo de questionamento e controvérsias. Fatores diversos têm sido responsabilizados por isso, desde o tempo decorrido após o implante (ALVES et al., 1999; MARTINS-TORRES et al., 1994; PERLA, 1936, TORRES et al., 1994), a massa de tecido implantado (BRADSHAW et al., 1982; HORTON et al., 1982; TAVASSOLI et al., 1973; VAN WYCK et al., 1980; VEGA et al., 1981), o local da enxertia (MANLEY & MARINE, 1917; PATEL et al., 1986; RODRIGUES et al., 1991; VEGA et al., 1981), a manutenção do pedículo vascular (COONEY et al., 1979; HORTON et al., 1982; VEGA et al., 1981); WESTERMANN et al., 1988; WILLFÜHR et al., 1992) e a idade dos animais de experimentação por ocasião do implante (SHINEFIELD et al, 1966; WESTERMANN et al., 1988, 1990).

PERLA, em 1936, demonstrou experimentalmente que a regeneração histológica do tecido esplênico implantado completa-se entre o 12^o e o 21^o dias pós-operatórios, percebendo-se finalmente a cápsula e trabéculas bem desenvolvidas.

Segundo ALVES et al. (1999), estudando a cinética da neovascularização de implantes esplênicos em elegante modelo experimental com ratos saudáveis, a

alteração maior encontrada em baços íntegros ou remanescentes vascularizados, comparado-se à morfologia dos enxertos é de que, nesses implantes, a fibrose pericapsular é mais intensa. A angiogênese pode ser precocemente percebida, pela formação de brotos vasculares que começam a penetrar os enxertos a partir do 3º dia após o implante.

Por volta do 28º dia, é verificada a reconstrução estrutural das polpas vermelha e branca; o trabalho de MARTINS-TORRES et al. (1994), confirmou essas observações, que também foram ratificadas neste estudo; os implantes, tanto de camundongos sadios como de esquistossomóticos, aparentavam vitalidade à necrópsia, realizada entre o 30º e o 35º dia após a operação.

A esplenomegalia induzida pela infecção esquistossomótica decorre basicamente de dois fatores: a hiperplasia linfática e reticuloendotelial em reação aos antígenos do parasito e a congestão decorrente da hipertensão portal determinada pela fibrose hepática (MAGALHÃES-FILHO & COUTINHO-ABATH, 1961).

Neste estudo, somente nos tecidos esquistossomóticos é que foram identificados granulomas. Isto corrobora observações anteriores de histologia do baço do animal parasitado (ANDRADE et al., 1998).

Sob ponto de vista microscópico, as estruturas esplênicas também foram restabelecidas nos enxertos de camundongos esquistossomóticos, leia-se: polpas vermelha e branca, trabéculas e cápsula, assemelhando-se muito proximamente aos baços intactos e remanescentes vascularizados.

Entre os animais esquistossomóticos, a única diferença observada entre o grupo de enxerto total e os demais grupos, nas colorações estudadas, foi um maior grau de fibrose intersticial, que parece estar intimamente relacionado ao processo cicatricial de regeneração do tecido. O mesmo foi percebido entre os grupos de animais sadios.

4.4 - Mensuração da Função no Enxerto Esplênico

Ao longo da História, ao contrário de outras vísceras do corpo humano, o baço sempre foi considerado como uma estrutura secundária, paralela, de função e valor desconhecidos. As referências dos antigos e medievais ao baço apenas conjecturavam sobre os efeitos que a perda do órgão trazia ao indivíduo. Galeno

referiu-se ao baço como “um órgão cheio de mistérios”; outros filósofos da Grécia Antiga como Hipócrates, Platão e Aristóteles, também fizeram referências nos seus manuscritos aos mitos e verdades sobre a natureza deste órgão (Mc CLUSKY et al., 1999a, 1999b).

Uma afirmação curiosa é de que a esplenectomia tinha como consequência modificar o humor, transformando uma pessoa antes expansiva e comunicativa em um sujeito sisudo e pouco afeito ao sorriso; outra é que as crianças que perdiam o baço “também perdiam a alegria de viver”. O termo baço, empregado como adjetivo na língua portuguesa (*embaçado*), confere o significado de “sem brilho” ao seu substantivo.

ROSNER, em 1972, publicou interessante artigo sobre as propriedades do baço baseado em escritos judeus antigos, a partir dos intitulados Babylonian Talmud (2º ao 6º séculos); não há referência ao órgão na Bíblia. Segundo Serenus Samonicus (século 3), acreditava-se que o baço seria responsável pela “simpatia” do organismo, de modo que “indivíduos com baço aumentado possuíam um humor bobo e, caso o tumor esplênico fosse extirpado, a alegria cessaria e essas pessoas desenvolveriam uma expressão grave nos seus semblantes”.

Tal característica foi reafirmada por escritos posteriores: Judah Halevi (1086 – 1145) – “o baço traz alegria porque é da sua natureza purificar o sangue e o espírito de matérias sujas e obscuras”; Moses DeLeon (século 13), citando Simeon ben Yochai, escreveu que “o baço produz alegria nas crianças”; Maimonides (1135 – 1204), no seu principal trabalho médico “The Aphorisms of Moses” destacou as propriedades purificadoras do sangue pelo baço, além de formular propostas terapêuticas para afecções do órgão (ROSNER, 1972).

A identificação da sepse fulminante pós-esplenectomia como entidade nosológica foi o ponto de partida para o aprofundamento da pesquisa clínica sobre a função do baço como componente importante das respostas imunes. Estudos em animais de experimentação sugeriam fortemente a relação entre esplenectomia e infecção (MORRIS & BULLOCK, 1919), e O'DONNELL (1929) já havia relatado o 1º caso da literatura, em revista de renome. Paralelamente, pesquisas sobre a capacidade de regeneração intencional (PERLA, 1936) ou espontânea (BUCHBINDER & LIPKOFF, 1939) do tecido esplênico eram descritas.

Entretanto, até meados do século passado, o baço era considerado órgão de menor importância no organismo humano, e a sua extirpação devido a lesões

traumáticas, ou acidentais durante operações do abdome superior, era a conduta assumida pela imensa maioria dos cirurgiões da época, prática essa que se ainda se estende até os dias atuais (Mc CLUSKY et al., 1999a, 1999b; MARQUES & PETROIANU, 2003; SPIRER et al., 1983).

O interesse pelo assunto surgiu após a célebre publicação de KING & SCHUMAKER (1952). A forma humilde, porém nobre e convincente, como esses autores relataram sua pequena casuística, tornou-se o ponto de partida do conhecimento médico para a conscientização coletiva da necessidade de pesquisadores se dedicarem com mais afinco ao estudo do baço como órgão vital, imprescindível ao bom funcionamento das respostas imunes do organismo como um todo.

Esse marco histórico motivou a interseção entre diferentes setores da pesquisa médica, exigindo a elaboração de modelos experimentais e modificações na prática clínica para a investigação e observação dos efeitos da esplenectomia sobre a imunidade; métodos laboratoriais foram desenvolvidos e incorporados, estabelecendo parâmetros capazes de avaliar a função esplênica, em diferentes situações (MARQUES & PETROIANU, 2003).

A sepse pós-esplenectomia, conforme pensava-se antes, atingia apenas crianças (ERICKSON et al., 1968); sabe-se hoje que, através da análise retrospectiva de prontuários, e entrevistas concedidas por parentes ou pelos próprios pacientes submetidos a esplenectomia por motivos diversos, episódios de infecções graves e até a morte podem ocorrer também em adultos, não importando o tempo decorrido após a intervenção (ASKERGREN & BJÖRKHOLM, 1980; FRANKE & NEU, 1981; O'NEAL & McDONALD, 1981; SCHWARTZ et al., 1982; STANDAGE & GROSS, 1982).

Assim, cirurgiões foram compulsoriamente questionados sobre a concepção de métodos alternativos de preservação, se não do todo, pelo menos de porções materiais de tecido esplênico, na expectativa de garantir, desse modo, algum rastro, ainda que conceitual, da sua função.

O baço, em condições normais, é sede de depuração de partículas presentes na circulação, atuando como um filtro seletivo de remoção e fagocitose de elementos indesejados ao organismo. Hemácias envelhecidas, apresentando os chamados corpúsculos de Howell-Jolly, são fagocitadas na intimidade do tecido esplênico; a pesquisa desses corpúsculos em hemácias circulantes no sangue periférico é

utilizada como parâmetro para a aferição da capacidade de atividade fagocitária do tecido esplênico após o implante (ANNEXTON, 1979; ORDA et al., 1981; PATEL et al., 1981; PEARSON et al., 1978; SPIRER et al., 1977b; ZOLI et al., 1993)

BRANDT et al. (1996, 1997, 1998b; 1998c; 2001), através desse método, verificaram que a atividade hemocaterética também era mantida em crianças esquistossomóticas portadoras de hipertensão portal, submetidas a esplenectomia e implante de fragmentos do baço no grande omento; dos 23 pacientes da série, apenas 2 apresentavam corpúsculos de Howell-Jolly no sangue periférico.

Outro método para mensurar a capacidade fagocítica do tecido esplênico foi proposto experimentalmente por PETROIANU & BARBOSA (1991), através da detecção à microscopia óptica, de partículas de tinta nanquim, injetadas via venosa, no interior de macrófagos de baços íntegros e remanescentes esplênicos de diferentes espécies de animais; o uso da técnica, entretanto, foi restrita ao campo experimental.

NAJJAR & NISHIOKA (1970), do laboratório de bioquímica da Universidade de Tufts, em Boston, identificaram e isolaram um tetrapeptídeo presente unicamente no tecido esplênico, com atividade leucofílica específica. Liberado na circulação pela ação de uma enzima presente na membrana externa dos neutrófilos (a leucocinina), esse fragmento peptídico possui efeito estimulador sobre as células fagocitárias; recebeu então a denominação de tuftsina.

Desde então, surgiram publicações que avaliam a função do enxerto esplênico através da dosagem da tuftsina no sangue periférico, tendo como controle indivíduos normais ou ainda indivíduos esplenectomizados, caso este em que os níveis séricos do peptídeo estão abolidos (COOPER et al., 1982; CONSTANTOPOULOS et al., 1973; HOSEA et al., 1981a; ORDA et al., 1981; SPIRER et al., 1977a, 1977b, 1983; ZOLI et al., 1994).

Estudos sobre a melhoria de atividade fagocítica de leucócitos polimorfonucleares estimulados pela tuftsina, *in vitro*, foram encorajadores para a concepção do seu uso em situações clínicas em que os níveis séricos estivessem decrescidos, estando inclusos, naturalmente, pacientes esplenectomizados (NAJJAR & NISHIOKA, 1970; PHILLIPS et al., 1981).

A administração intramuscular de gamaglobulina a uma adolescente de 15 anos de idade que apresentava deficiência da tuftsina sérica (assim como 2 de seus parentes próximos), apesar de eusplênica, com quadros recorrentes de infecções

respiratórias resistentes a antibióticos, resultou numa resposta "dramática e excelente". O grupo da Universidade de Tufts inferiu que, contendo tuftsina ligada à leucocinina, a gamaglobulina foi capaz de repor a necessidade do peptídeo. (CONSTANTOPOULOS et al., 1972; NAJJAR & CONSTANTOPOULOS, 1972). Por essa época, a tuftsina purificada não era disponível para uso *in vivo*.

Estudos posteriores, realizados *in vitro* pelo mesmo grupo, no soro de pacientes portadores de mielofibrose ou leucemia (CONSTANTOPOULOS et al., 1973) ou no soro de pacientes esplenectomizados (PHILLIPS et al., 1981), não constatarem benefício da atividade fagocitária através da estimulação de leucócitos com a tuftsina.

Aos poucos, assim, o assunto foi sendo relegado a um plano secundário, motivando a publicação de editorial questionando o real valor da tuftsina (MIKULSKY et al., 1977), em importante periódico.

Em modelo experimental com ratos submetidos a operação simulada, esplenectomia total e esplenectomia com autoimplante, e tratados profilaticamente com tuftsina ou placebo intraperitoneal, TESLUK & THOMAS (1979) observaram que não houve diferença entre os diversos grupos de animais quanto à mortalidade, quando desafiados com a injeção intravenosa de pneumococos.

Posteriormente, estudo *in vivo* com camundongos, em modelo de sepse intraabdominal, verificou que a administração intramuscular da tuftsina não reduziu a mortalidade no grupo de animais esplenectomizados (BAKER et al., 1984) quando comparado ao grupo de esplenectomia tratados com placebo.

No mesmo ano, CHU et al. (1984), estudaram camundongos submetidos a operação simulada, esplenectomia total e esplenectomia com autoimplante; 3 meses após as operações, foi realizada administração intramuscular de tuftsina ou placebo e, 2 horas depois, a injeção intravenosa de 1×10^2 pneumococos suspensos em solução salina. A mortalidade foi menor entre os animais com autoimplantes e também naqueles tratados com tuftsina do que entre os esplenectomizados que receberam placebo.

Autores afirmam que a técnica de radioimunoensaio não permitia obter um composto purificado, livre de contaminantes, e que, com o advento do método de HPLC, tornou-se possível obter informações mais fidedignas sobre o composto e sua atividade (NAIM et al., 1987; NISHIOKA et al., 1991; SIDDIQUI et al., 1995).

BRANDT et al (1998a, 2001) estudaram as concentrações da tuftsina pelo ELISA, no soro de 14 crianças esquistossomóticas submetidas ao implante esplênico autólogo heterotópico; quando comparado aos níveis séricos pré-operatórios de 6 delas, e ao soro de 4 crianças não-esquistossomóticas, não houve diferença entre os grupos.

Outro método disponível para a documentação em imagem do baço ou seu remanescente, é a realização da cintilografia com enxofre coloidal marcado com tecnécio^{99m} (PETROIANU, 1993b, 1993c), que também permite a verificação da regeneração vascular dos enxertos esplênicos, capacitando, ainda, a visualização e o registro gráfico do tecido implantado (MILLIKAN et al., 1982).

Na casuística do HC-UFPE, todas as 23 crianças foram submetidas à cintilografia; a imagem captada não foi considerada satisfatória, e correspondeu ao achado de corpúsculos de Howell-Jolly nas hemácias do sangue periférico em apenas 2 crianças, anteriormente citadas (BRANDT et al., 1998b, 1998c, 2001).

Apesar de fornecer uma documentação da viabilidade vascular e possibilitar a confirmação de que os esplenócitos do enxerto são capazes de captar o radiofármaco, a cintilografia não garante haver acontecido a regeneração funcional, sob o ponto de vista imunológico, do tecido implantado.

Estudos também avaliam a resposta de enxertos através da dosagem, no sangue periférico, de imunoglobulinas e componentes do sistema do complemento.

Foi demonstrado por LIKHTE (1975), que, em ratos submetidos ao autoimplante heterotópico de tecido esplênico, tanto a atividade da gamaglobulina leucofílica como a opsonização de bactérias retornam ao normal, o que não acontece em animais esplenectomizados.

COONEY et al. (1979) verificaram, em ratos, que os títulos de anticorpos foram mais elevados em ratos com baços intactos, com esplenectomia parcial e com reimplante esplênico, quando comparados com animais submetidos a esplenectomia total. O grupo de esplenectomia parcial apresentou níveis séricos mais elevados de imunoglobulinas do que o grupo de enxerto esplênico, quando comparados entre si. Os autores inferiram que o volume de tecido esplênico, assim como a preservação do fluxo sanguíneo original contribuíram significativamente para a maior produção de anticorpos.

CORRY et al., em 1979, estudaram a via alternativa de ativação do complemento no soro de pacientes portadores de hipogamaglobulinemia, de *sickle*

cell disease, comparando-os a pacientes esplenectomizados e a controles sadios. O grupo esplenectomizado não diferiu do controle sadio, cuja atividade foi significativamente maior em relação aos outros 2 grupos. Anormalidades da resposta imune são comuns em pacientes esplenectomizados: deficiência de Ig M sérica, da remoção de partículas da corrente sanguínea e da atividade da tuftsina. A maior susceptibilidade a infecções no asplênico, segundo os pesquisadores, talvez esteja associada a defeitos na via alternativa de ativação do complemento, levando a falhas na opsonização e fagocitose de bactérias circulantes, a partir do fragmento Fc da Ig G.

GUERRA et al. (1991), em adultos submetidos a esplenectomia, e BRANDT et al. (1995), em crianças submetidas a esplenectomia e implante esplênico, todos eles operados por hipertensão portal esquistossomótica, realizaram a análise sequencial das imunoglobulinas G, A e M e dos componentes 3 e 4 do sistema de complemento. Verificaram que, após a operação, tanto em adultos como em crianças, há um aumento nos níveis séricos de Ig G e Ig M.

Uma forma freqüentemente utilizada pelos pesquisadores para analisar a capacidade de defesa orgânica na resistência a infecções, promovida pela regeneração dos enxertos esplênicos, é através da exposição experimental de animais a bactérias; em geral, cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

LIKHITE (1975) estudou a opsonização e a atividade leucofílica da gamaglobulina de leucócitos polimorfonucleares do soro de ratos, confrontando-os, *in vitro*, com cepas de pneumococos.

Diferentes vias de inoculação são empregadas, predominando a injeção da suspensão dos micróbios por via intravenosa (BAKER et al., 1984; BRADSHAW & THOMAS, 1982; CHU et al., 1984; COONEY et al., 1979; HOSEA et al., 1981b; SHINEFIELD et al., 1966; STEELY et al., 1988; TESLUK & THOMAS, 1979; VAN WICK et al., 1980).

Em complexo modelo, formulado com coelhos anestesiados, HORTON et al. (1982), cateterizaram a artéria carótida para a injeção intracardíaca das bactérias, e a veia femoral para coleta de sangue.

A administração intraperitoneal da suspensão de bactérias foi a via escolhida por DAJEE et al. (1982) e PATEL et al. (1982).

Procurando mimetizar a contaminação por via respiratória que geralmente ocorre na sepse fulminante pós-esplenectomia, DICKERMAN et al. (1979)

expuseram ratos submetidos a esplenectomia e ratos com esplenectomia e enxertos esplênicos à inalação de um aerossol contendo pneumococos, um modelo animal próximo da via de infecção humana. A mortalidade foi significativamente maior nos animais asplênicos.

HEBERT et al. (1983) trataram profilaticamente camundongos controle e esplenectomizados com injeção intraperitoneal de placebo ou de um imunomodulador (vacina de *Corinebacterium parvum*), respectivamente, expondo-os em seguida ao aerossol de pneumococos. O clareamento de bactérias da circulação foi maior e mais rápido nos animais vacinados.

Apesar de sua concepção ser extremamente racional sob o ponto de vista teórico, sob a ótica da execução prática os estudos de confrontação entre bactérias e animais de experimentação apresentam dificuldades consideráveis para o observador; pequenas diferenças na carga contaminante de bactérias podem alterar significativamente os resultados, assim como resultados podem não ser fielmente reproduzidos devido a modificações entre cepas de um mesmo micróbio. São essenciais as condições estritamente estéreis de manipulação do material, e, apesar do nível de treinamento, existem chances de contaminação do experimento e de acidentes de trabalho entre os membros da equipe.

4.5 - Subpopulações de Linfócitos e Citometria de Fluxo

Muitas dúvidas ainda permanecem sem resposta sobre os mecanismos que modulam as respostas imunes promovidas pelo baço intacto, por sua remoção ou disfunção e pelo tecido esplênico autoimplantado (COONEY et al., 1979; RICE & JAMES, 1980; SCHWARTZ et al., 1978).

A contribuição desse estudo reside em grande parte na formulação de um modelo experimental simplificado, factível e convincente, em animais sadios e esquistossomóticos, que possibilita o estudo do tecido esplênico autoimplantado sob os mais diferentes métodos conhecidos e disponíveis na atualidade, ou que venham a ser biotecnologicamente desenvolvidos.

Nesta pesquisa, o tecido esplênico resgatado dos enxertos apresentou características histológicas semelhantes ao baço íntegro e remanescente vascularizado, tanto em animais sadios como em esquistossomóticos. Similarmente, o percentual das subpopulações de linfócitos T estudado pela citometria de fluxo foi

restaurado. Sob esta ótica, serão discutidos aspectos relacionados às respostas imunes, e, principalmente, à imunidade específica mediada por células.

Uma vez ultrapassadas as barreiras físico-químicas de proteção da pele e mucosas, microorganismos e substâncias proteicas (antígenos) invadem o plano subepitelial do hospedeiro, o que dispara os mecanismos da resposta à contaminação presentes no sangue, linfa e tecidos (ABBAS et al., 2000a; ADEODATO & FERREIRA-FILHO, 2001; ADEODATO & LIMA, 2003).

O baço é o maior órgão do sistema retículo-endotelial, e sua falência, seja por ausência congênita ou por retirada cirúrgica (independente da causa), ou ainda conseqüente a doenças imunodepressoras, torna o indivíduo asplênico mais susceptível a infecções (AAGERGE et al., 1984; FRANKE & NEU, 1981; ORDA et al., 1981).

Estudos em animais, realizados *in vitro* e *in vivo*, confrontaram-nos com antígenos ou cepas de bactérias; na maioria deles, foram verificadas respostas imunes deficitárias em animais submetidos a esplenectomia total, com maior mortalidade e menor capacidade de clareamento fagocitário das bactérias da corrente circulatória, quando comparados a animais submetidos à operação simulada ou ao autoimplante esplênico. Aspectos relacionados com diferentes mecanismos da imunidade como opsonização, atividade leucofílica da gamaglobulina de leucócitos polimorfonucleares, fagocitose, produção de mediadores inflamatórios e ação de imunoglobulinas foram responsabilizados pelos autores na explicação dos resultados observados (BAKER et al., 1984; BRADSHAW & THOMAS, 1982; CHU et al., 1984; COONEY et al., 1979; DAJEE et al., 1982; DICKERMAN et al., 1979; HEBERT et al., 1983; HORTON et al., 1982; HOSEA et al., 1981a; LIKHTE, 1975; PATEL et al., 1982; SHINEFIELD et al., 1966; STEELY et al., 1988; TESLUK & THOMAS, 1979; VAN WICK et al., 1980).

O baço desempenha importante papel na resposta imune inespecífica, elaborando substâncias leucofílicas, tuftsin e properdina, compostos proteicos que estimulam neutrófilos, macrófagos e as células NK, principais responsáveis pelo mecanismo de fagocitose, na função de eliminar esses antígenos circulantes. Age ainda sobre outras proteínas presentes na circulação, como o sistema de complemento e mediadores da inflamação, otimizando a opsonização, a fagocitose e a lise dos elementos agressores. O baço *in situ*, com o seu volume e suprimento arterial intactos, funciona com um filtro, promovendo a remoção mais eficiente

dessas partículas antigênicas do sangue circulante, na intimidade da sua estrutura ou facilitando sua eliminação pelas células de Kupffer, no fígado (MARQUES & PETROIANU, 2003; PETROIANU, 1993a).

Atua também sobre a resposta imune específica, que dispõe de mecanismos mais evoluídos de combate a estímulos antigênicos tanto na sua fase humoral como na fase celular. A imunidade específica depende de linfócitos, células do sistema hemolinfopoiético que sofrem maturação ou na medula óssea (linfócitos B - referente à *bursa de Fabricius* das aves), ou no timo (linfócitos T).

Os linfócitos B, mediadores da resposta imune específica humoral, são as únicas células capazes de produzir imunoglobulinas (anticorpos), proteínas circulantes que se ligam a receptores presentes na superfície dos antígenos, favorecendo seu reconhecimento, opsonização e a atuação dos fagócitos, entre outras funções.

Os linfócitos T, responsáveis pela resposta imune específica celular, são divididos em classes a partir da sua função específica, expressando diferentes proteínas na membrana celular, denominados CDs, que conferem identidade a diferentes subpopulações celulares que, quando ativados por moléculas estranhas presentes na superfície ou no interior de células, desenvolvem a capacidade de diferenciação, multiplicação e atuação sobre micróbios, sobre células que se tornaram impróprias à homeostase do organismo, ou sobre as próprias células do sistema imune contaminadas por estímulos antigênicos.

Sua atuação é altamente seletiva, regulando as respostas imunes aos antígenos proteicos e servindo também como células efetoras para a eliminação dos antígenos intracelulares. Essas células agem reconhecendo o estímulo antigênico e informam o sistema sobre a presença deles, desencadeando a multiplicação celular de clones específicos que atacarão o invasor de modo determinado, duramente, até destruí-lo; esta é resposta imune específica. Paralelamente, interagem com as células e demais componentes da imunidade inespecífica, otimizando-a.

Os linfócitos **CD4**, chamados **auxiliares**, constituem-se em uma subpopulação celular, funcionalmente bem definida, tendo como principal função a secreção de hormônios proteicos, as **citocinas**, que promovem o **reconhecimento** de antígenos peptídicos e a **ativação** de outras células que atuarão na fase **efetora** das respostas imunes; os linfócitos CD8, denominados **citolíticos** ou **citotóxicos**, possuem capacidade fagocítica e, junto com as células NK e fagócitos da imunidade

natural destroem as substâncias invasoras associadas a células (antígenos não-solúveis). Linfócitos **CD45RB** são células de **memória** que armazenam informações sobre a estrutura molecular dos antígenos de forma a reconhecê-los precocemente a partir de um novo contato, produzindo respostas mais precoces, intensas e eficazes.

Uma outra classe de linfócitos T, conhecidos como **supressores**, parece estar associada à inibição das respostas imunes; entretanto, vários aspectos referentes à natureza e função dessas células permanecem motivo de considerável controvérsia entre estudiosos do assunto; o principal impedimento para o seu estudo mais profundo consiste na dificuldade de purificá-las em nº suficiente para análises bioquímicas e imunofenotipagem adequadas. Confusões foram historicamente criadas, e parece provável que as células T supressoras não formem uma classe peculiar de células, mas na verdade sejam linfócitos que podem apresentar respostas imunes de diferentes maneiras. Por esta razão e para evitar as implicações da antiga terminologia, os imunologistas têm proposto uma nova terminologia para esta população: células "**reguladoras**" ou "**supressivas**" (ABBAS et al., 2000b).

O comportamento das subpopulações linfocitárias de pacientes esquistossomóticos tem sido investigado no sangue periférico (BRANDT et al., 1995; COLLEY et al., 1982; JUNQUEIRA et al., 1990) ou em tecido esplênico obtido do baço íntegro (MARTINS-FILHO et al., 1998; EL-CHEIKH et al., 1994; SANTOS et al., 1991), através de diversos métodos.

DURIG et al. (1984) estudaram as subpopulações linfocitárias no sangue periférico de pacientes submetidos a esplenectomia e autoimplante, porém que não eram portadores de esquistossomose; similarmente, apesar de haverem analisado o enxerto esplênico autoimplantado em caráter experimental, WESTERMANN & PABST (1997) o fizeram em ratos saudáveis.

Até o presente momento, portanto, nenhum trabalho da literatura aferiu as subpopulações de linfócitos no tecido esplênico esquistossomótico autoimplantado.

Sabe-se que a forma avançada da esquistossomose leva a uma redução do nº total de linfócitos e linfócitos T circulantes, apesar do aumento do nº de linfócitos B, o que está aparentemente associado com a elevação dos níveis séricos de Ig G e Ig M (BRANDT et al., 1995; COLLEY et al., 1982; GUERRA et al., 1991; JUNQUEIRA et al., 1990).

DURIG et al. (1984), no seu estudo, observaram que o nº total de linfócitos T, assim como as subpopulações de CD4 e CD8 sofrem aumento significativo no sangue periférico, especialmente na subpopulação de CD8, causando uma redução na relação CD4/CD8.

SANTOS et al (1991), através do mapeamento de linfócitos por imunohistoquímica no baço de adultos esquistossomóticos, também chegaram à mesma conclusão, apesar de seus pacientes não terem recebido autoimplante de fragmentos do baço, removido por hipertensão portal esquistossomótica.

Este padrão de linfocitopenia no sangue periférico foi posteriormente corroborada por BRANDT et al. (1995), em crianças esquistossomóticas; após a esplenectomia e o autoimplante esplênico, há um aumento significativo dessas células no sangue circulante, especialmente na subpopulação de linfócitos CD8 (denominados *supressor* no estudo). Os marcadores fenotípicos dessas células não foram descritos no método, impossibilitando a confrontação das informações com este estudo.

WESTERMANN & PABST (1997), estudando autoimplantes de baço em ratos através de imunohistologia, constatou que macrófagos e linfócitos T e B sobrevivem à fase inicial de necrose dos fragmentos, e que a pesquisa dessas células no próprio enxerto esplênico constitui-se em evidência mais forte e convincente da regeneração dos compartimentos esplênicos, do que quando analisadas no sangue periférico.

EL-CHEIKH et al. (1997) analisaram, por citometria de fluxo, as subpopulações linfocitárias B e T no baço de camundongos, em diferentes fases evolutivas da esquistossomose; a doença provoca modificações complexas no percentual dessas populações celulares, ainda de difícil elucidação quanto ao seu mecanismo. Na fase aguda predomina a resposta mediada por linfócitos B, enquanto que na fase crônica prevalecem os linfócitos T; esta observação, segundo os autores, sugere que se estabelece um relativo equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro, ao longo do tempo.

MARTINS-FILHO et al. (1998), estudaram linfócitos B e T pelo mesmo método, no baço íntegro e no sangue periférico de pacientes com e sem esquistossomose; foi definido um parâmetro básico de referência para as subpopulações linfocitárias no baço, identificado como um importante sítio de ativação dessas células. Apesar de terem sido detectadas diferenças entre as subpopulações CD4 e CD8 no sangue periférico entre os grupos, o mesmo não foi

verificado no tecido esplênico entre os pacientes esplenectomizados por hipertensão portal esquistossomótica e aqueles esplenectomizados por trauma.

O mesmo grupo de pesquisadores, estudando linfócitos circulantes na fase aguda da esquistossomose, verificaram que há um aumento significativo de CD4, enquanto em indivíduos assintomáticos na fase crônica apresentam predomínio de CD8. Na forma hepatosplênica da doença, entretanto, ambas as subpopulações linfocitárias estão aumentadas no sangue periférico (MARTINS-FILHO et al., 1999).

Por outro lado, SMITH et al. (1999), encontraram redução do percentual de linfócitos CD4 e CD8 em autoimplantes esplênicos e também em baços desarterializados de ratos saudáveis, quando comparados ao percentual das mesmas subpopulações em baços intactos, embora as populações de linfócitos B e de macrófagos tenham se mantido preservadas no tecido esplênico, entre 6 a 9 meses após as intervenções.

Autores continuam em desacordo em relação aos autoimplantes esplênicos quanto à sua capacidade de proteger o indivíduo contra infecções bacterianas, e não foi pretensão desta pesquisa dirimir tais questionamentos, mas apenas contribuir adicionando informações obtidas através de um método criterioso. Necessário se faz afirmar que muito ainda há de ser pesquisado até que se possa decidir, com embasamento científico, que um baço retirado deva ou não deva ser encaminhado ao Serviço de Patologia de um hospital, ou fatiado e autoimplantado em uma bolsa confeccionada no grande epíplon do paciente.

4.6 - Considerações Finais

Mesmo com o advento de técnicas mais atuais e precisas de avaliação de fenômenos que ocorrem na Natureza, o ser humano há de se conformar com a sua incapacidade de estabelecer, de modo precoce e preciso, a verdade científica; é salutar a crítica a conceitos estabelecidos e tidos como inquestionáveis... a História, junto com o Tempo, a curiosidade e a capacidade inventiva próprias da espécie têm derrubado aforismas, hipóteses, teses e teorias infalíveis.

É nos linfonodos, e principalmente no baço, que se processam as interações bidirecionais das respostas imunes inespecífica e específica. Foi verificado que os enxertos esplênicos são capazes de restabelecer as subpopulações linfocitárias,

comparados a remanescentes esplênicos e baços intactos de camundongos sadios e esquistossomóticos.

É importante ainda salientar que a imunidade celular mediada pelos linfócitos T é responsável também pela vigilância do organismo quanto ao surgimento de tumores e alterações na estrutura do DNA que possam modificar os mecanismos normais de divisão celular e regeneração tecidual. Assim, um sistema imune atento é imprescindível à manutenção da integridade do organismo contra as agressões, sejam elas externas, ou formadas na própria intimidade do indivíduo (ABBAS et al., 2000b).

O modelo experimental aqui apresentado mostrou-se eficiente; o estudo histológico confirmou a regeneração estrutural do tecido esplênico esquistossomótico autoimplantado, que ocorre de modo semelhante à regeneração de fragmentos de tecido esplênico normal; verificou-se que o percentual das subpopulações linfocitárias estudadas nos enxertos esplênicos de camundongos sadios e esquistossomóticos são restabelecidas.

Os resultados observados nesse estudo acrescentam novos dados em relação à cirurgia do baço; apesar do entendimento já existente por parte de alguns cirurgiões e, talvez até por algumas escolas de cirurgia, sobre a importância do baço no sistema imune, permanece freqüente a prática da esplenectomia total, pura e simples.

Sem dúvida, é diante do paciente vítima de trauma que o cirurgião mais comumente defronta-se com a necessidade de decidir sobre a execução de uma esplenectomia ou tentar investir na preservação do baço, ou pelo menos, de parte dele. A esplenectomia total parece haver sido amplamente adotada como procedimento de escolha para controle do sangramento do órgão, até mesmo para pequenas lesões, incluindo avulsões superficiais da cápsula esplênica, ocorridas acidentalmente durante outras intervenções no abdome superior. Técnicas de preservação são apresentadas de maneira detalhada e sistematizada como alternativa preferencial à esplenectomia, em quaisquer situações (MORGENSTERN & SHAPIRO, 1979).

PETROIANU (1993a) defende com entusiasmo a realização da esplenectomia subtotal com preservação do polo superior do baço para o trauma e também para um grande número de afecções do órgão, desde que não haja contra-indicações formais para a permanência do remanescente esplênico suprido pelos vasos curtos.

Entretanto, alerta enfaticamente que "a cirurgia conservadora do baço... deve ser realizada somente por cirurgiões que tenham intimidade com a rafia de órgãos parenquimatosos e conheçam os princípios da anatomia segmentar do baço. Se o sangramento for de difícil controle, se o paciente não estiver em bom estado geral para a cirurgia ou se o cirurgião tiver dúvidas em relação à cirurgia conservadora, é preferível que seja realizada a esplenectomia total". O autor questiona o valor do autoimplante em promover funcionalidade na defesa contra bactérias.

Os resultados aqui apresentados consubstanciam o projeto que vem sendo desenvolvido, na prática, no Serviço de Cirurgia Pediátrica do HC-UFPE; as crianças esquistossomóticas que receberam o autoimplante do baço têm apresentado, em sua maioria, evidências de possuírem atividade esplênica residual, amplamente discutidas neste trabalho. Diferentemente do que ocorre na esplenectomia subtotal, esse procedimento, além de se constituir em proposta de fácil aprendizado e execução sob o ponto de vista técnico, não prolonga o tempo operatório em mais do que 10 a 20 minutos, quando devidamente sistematizado pela equipe cirúrgica.

No Brasil, pela maior prevalência do trauma e hipertensão portal esquistossomótica comparados às demais causas de indicação de esplenectomia, serão essas as situações, em caráter emergencial ou eletivo, nas quais o cirurgião terá que decidir mais freqüentemente sobre a colocação, ou não, de fragmentos de tecido esplênico no grande omento do seu paciente.

É pertinente o pensamento expresso por Hnshaw de que "...aquele baço estava ali implorando para ser seccionado em fatias e implantado em uma bolsa omental"; segundo ele, "... todos os dados clínicos e experimentais até hoje mostram que o baço inteiro é melhor do que parte do baço e que algum baço é melhor do que nenhum" (PATEL et al, 1981).

Avaliar subpopulações linfocitárias pela citometria de fluxo constitui-se em uma arma recente e poderosa para a elucidação dos mecanismos determinantes das respostas imunes do organismo frente aos diferentes estímulos antigênicos. A imunofenotipagem com anticorpos monoclonais tem conseguido conhecer e estabelecer diferenças importantes entre essas e outras células. Espera-se que, em poucos anos, o conhecimento adquirido passo a passo, através desse e de outros métodos avançados de investigação, sobre o que realmente ocorre em relação aos linfócitos na esquistossomose e em autoimplantes esplênicos, já tenha possibilitado a compreensão dos mecanismos que regem a imunidade.

A investigação sistemática de variáveis implicadas no processo de defesa orgânica, qualquer que seja o método empregado, visando não apenas **observar o fenômeno (resultado estático)**, mas principalmente **interpretar o mecanismo (resultado cinético)** pelo qual ele ocorre, é imprescindível para a melhor compreensão da complexidade das respostas imunes. Muitos aspectos da imunidade natural e, mais ainda, das fases humoral e celular da imunidade específica ainda estão por ser desvendados, porém a Imunologia tem avançado de forma contínua e segura como área do conhecimento; o futuro da ciência será capaz de valorizar cada degrau galgado nas informações colhidas principalmente nos laboratórios de pesquisa em genética, bioquímica e imunologia.

A consolidação e a análise criteriosa dos dados obtidos a partir de estudos em animais de experimentação tornarão possível considerar, guardadas as devidas diferenças entre as espécies e os limites impostos por essa condição, a sua extensão para a prática clínica diária, em benefício do ser humano.

Ainda que tenham sido observadas diferenças entre grupos pareados de camundongos em relação a algumas subpopulações linfocitárias de baços íntegros e remanescentes esplênicos em relação aos enxertos, o padrão histológico de regeneração mostra tecido estruturalmente viável, o que permite inferir que sejam também funcionalmente atuantes; talvez não como reservatórios destas subpopulações estudadas, porém em outras, que expressem antígenos de membrana/superfície diferentes, e que, para identificá-los, basta apenas progredirmos no isolamento de anticorpos específicos para isto. É possível mesmo que possuam função até mais definida e importante na resposta imune do que os linfócitos aqui estudados.

Baços ainda terão que ser removidos cirurgicamente para a cura de doenças; a esplenectomia parcial consiste em uma técnica que exige grande familiaridade da equipe cirúrgica com a anatomia vascular do órgão e acúmulo de experiência com o procedimento, com possíveis taxas de tempo operatório, insucesso no controle da hemorragia, ressangramento pós-operatório, relaparotomias e mortalidade maiores do que os enxertos esplênicos.

Ademais, considerando que a maioria das situações em que um cirurgião defronta-se com a necessidade de decidir sobre a esplenectomia ou cirurgia conservadora do baço acontece nas emergências, diante de uma vítima de trauma, em condições costumeiramente desfavoráveis, a possibilidade de enxertia de

fragmentos de baço no grande omento nos parece ser uma opção razoável a ser adotada, especialmente tendo-se em mente que é um procedimento simples, realizável após o controle do dano no traumatizado, e que pode ser conduzido por mãos menos experientes.

O avanço da ciência da Imunologia (com o apoio íntimo da Fisiologia, da Bioquímica e da Genética) tem trazido, e certamente trará cada vez mais ao Homem, opções de pesquisar e compreender mais profundamente, as reações celulares e moleculares que norteiam o processo da Vida. Estamos apenas engatinhando...

Certamente várias doenças já conhecidas e processos patológicos ainda não devidamente esclarecidos terão de ser vislumbrados e estudados e conhecidos sob outro ângulo do conhecimento. Isto trará inúmeras possibilidades e situações, inimagináveis neste momento da Arte Médica, porém não é difícil conceber que profundas modificações em relação à prevenção, diagnóstico e tratamento de enfermidades acontecerão em um futuro próximo, assim espera-se.

A Cirurgia, braço fundamental da prática médica ao longo da História, e cujo avanço sempre foi limitado pelos chamados "demônios de Halsted": hemorragia, dor e infecção, tem evoluído significativamente nas últimas décadas com as contribuições ofertadas pelas ditas "ciências básicas" supracitadas, especialmente em relação ao controle da infecção. Desses demônios, é seguramente o mais poderoso, e continua a rondar as salas de operações, leitos de terapia intensiva e as mentes de pacientes e cirurgiões.

Operar significa invadir um corpo; a úlcera péptica já foi tratada com a vagotomia e hoje é controlada com medicamentos. Isto foi um avanço da terapêutica. Ainda que restem doenças de tratamento essencialmente cirúrgico à luz do conhecimento atual (como o Trauma), é possível antever que vários processos patológicos, hoje tratados com operações, serão tratados de modo diferente no futuro.

Na verdade, modelos experimentais que confrontam bactérias e o indivíduo esplenectomizado, com remanescente vascularizado ou com enxerto esplênico são aqueles que parecem avaliar a função imunológica residual do modo mais objetivo... é um teste direto! No entanto, é imprescindível a perscrutinação de métodos de avaliação dos mecanismos que modulam as respostas imunes nesses pacientes. Aqui no nosso meio, apesar da redução no número de pacientes portadores da

forma grave de esquistossomose, cidadãos continuam perdendo o baço pelos mais diferentes motivos, especialmente vítimas da violência urbana. Consideremos, então, e pelo menos por enquanto, a adequação da proposta do autoimplante esplênico na esquistossomose...

QUE É UMA DOENÇA INFECCIOSA, DE CUNHO SOCIAL,
PASSÍVEL DE PREVENÇÃO E CONTROLE,
E, ESSENCIALMENTE,
NÃO É UMA DOENÇA CIRÚRGICA...

Talvez, daqui a um tempo, a experimentação em animais tenha sido substituída por métodos mais preservacionistas (ou ambientalistas) eticamente ainda mais respeitadores da biodiversidade, permitindo a aquisição de conhecimentos sob um prisma mais humanístico... talvez eles já existam... acredito piamente que não estamos sozinhos no Universo...

O verdadeiro cirurgião...

..., antes de ser um estupendo açougueiro que, apesar de toda a precisão dos cortes que executa para separar os tecidos, por mais precisos que eles sejam, nunca interferem de fato sobre a existência do objeto do seu trabalho;

... se assemelha mais a um geógrafo, comparando distâncias, extensão e profundidade, latitude e longitude;

... é, antes de tudo, um exigente artista, pois com as mãos desenvolve a sua obra, esculpindo com instrumentos, na carne viva, a simetria ou assimetria das formas que garantirão não apenas a beleza estética, externa, superficial e estereotipada, mas também a beleza interior, no mais das vezes escondida aos olhos, da integridade funcional do ato que praticou;

... deve se aproximar de um jardineiro que, também através das mãos, poda, corta e amputa seres vivos, porém sempre tendo em mente o objetivo maior de preservar a Vida, plantando mudas, transferindo raízes e guardando, examinando e favorecendo grãos que, ao serem semeados em terra fértil, serão capazes de insistir, persistir, resistir, crescer e reproduzir os melhores frutos...

5 – CONCLUSÃO

Nas condições de experimentação em que este estudo foi conduzido, pode-se concluir que as subpopulações de linfócitos CD4, CD8 e CD45RB são restabelecidas nos autoimplantes esplênicos de camundongos sadios e esquistosomóticos, não havendo diferença significativa quando comparados aos baços intactos e remanescentes esplênicos vascularizados.

6 - REFERÊNCIAS

Aagerge, IS; Heier, HE; Hem, E; Giercksky, F; Grong, EC. IgM and IgG response to pneumococcal polysaccharide vaccine in normal individuals and individuals splenectomized due to trauma. **Acta of Pathology, Microbiology and Immunology - Scandinavian Section**, v.92, p.11-16, 1984.

Abbas, AK; Lichtman, AH; Pober, JS. Propriedades gerais das respostas imunes. In **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro, Ed. Revinter, 2000a.

Abbas, AK; Lichtman, AH; Pober, JS. Células e tecidos do sistema imune. In **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro, Ed. Revinter, 2000b.

Abe, T; Masuda, T; Satodate. Phagocytic activity of Kupffer cells in splenectomized rats. **Virchow's Archives of Anatomic Pathology and Anatomic Histopathology**, v.413, n.5, p.457-462, 1988.

Abramsson-Zetterberg, L; Grawe, J; Zetterberg, G. Erythropoiesis and the induction of micronuclei in mouse spleen determined by flow cytometry. **Mutation Research**, v.394, n.1-3, p.17-28, 1997.

Adeodato, LCL. **Relaparotomias: indicações, complicações e resultados**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1991, 164 p.

Adeodato, LCL & Ferraz, EM. Papel de prováveis erros técnicos e táticos na gênese das relaparotomias - Análise da ocorrência em 94 pacientes. **Revista do Hospital da Restauração**, v.3, p.23-27, 1992.

Adeodato, LCL & Ferreira-Filho, HA. Cicatrização das feridas. In: Ferraz, AAB et al. (Editores). **Bases da técnica cirúrgica e da anestesia**. Recife, Ed. Universitária, UFPE, 2001.

Adeodato, LCL & Lima, LFC. Prevenção da infecção do sítio cirúrgico. In: Ferraz, AAB; Mathias, CAC; Ferraz, EM. **Condutas em cirurgia geral**. Rio de Janeiro, Ed. MEDSI, 2003.

Aigner, K; Dobroschke, J; Weber, EG; Schwemmler, K; Bauer, M; Teuber, J; Helmke, K. Successful reimplantation of splenic tissue after neonatal abdominal trauma. **The Lancet**, v.1, p.360-361, 1980.

Al-Salem, AH; Al-Dabbous, I; Bhamidibati, P. The role of partial splenectomy in children with thalassemia. **European Journal of Pediatric Surgery**, v.8, p.334-338, 1997.

Alvarez, SR; Fernandez-Escarlante; Rituerto, CD; Andersen, V; Cohn, J; Sorensen, SF. Assessment of post-splenectomy residual splenic function in splenic auto-transplants. **Internal Surgery**, v.72. p.149-153, 1987.

Alves, JA; Viana, G; Magalhães, MM; Arantes, RME; Coelho, PMZ; Cunha-Melo, JR. Kinetics of neovascularization of splenic autotransplants in mice. **Journal of Anatomy**, v.195, p.387-392, 1999.

Alwmark, A; Bengmark, S; Gullstrand, P; Schalen, C. Improvement of the splenectomized rat model for overwhelming pneumococcal infection. **European Surgical Research**, v.13, p.339-343, 1981.

Andrade, ZA & Cheever, AW. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ("pipestem fibrosis"). **Internal Journal of Experimental Pathology**, v.74, p.195-202, 1993.

Andrade, ZA; Silva, LM; Souza, MM; Sadigursky, M; Barbosa, A; Oliveira, IR. Role of the spleen on the pathogenesis of schistosomal periportal (pipestem) fibrosis of the liver: an experimental approach. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n.4, p.557-562, 1998.

Annexton, M. Autotransplantation of spleen tissue after trauma: encouraging evidence. **Journal of The American Medical Association**, v.241, n. 5, p.437-438, 1979.

Araújo, FG; Coelho, PMZ; Pereira, LH; Pellegrino, J. Schistosoma mansoni: Impairment of the cell-mediated immune response in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 28, p.289-291, 1977.

Arruda, SM; Santoro, F; Sadigursky, M. Evaluation of spleen cell population and effect of splenectomy on granuloma modulation in BALB/c mice infected with Schistosoma mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, n.1, p.97-102, 1993.

Askergren, J; Björkholm, M. Post-splenectomy septicemia in Hodgkin's disease and other disorders. **Acta Chirurgica of Scandinavia**, v.146, p.569-575, 1980.

Baker, CC; Gaines, HO; Niven-Fairchild, AT. The effect of tuftsin and splenectomy on mortality after intra-abdominal infection. **Journal of Surgical Research**, v.36, p.499-502, 1984.

Balfanz, JR; Nesbit Jr, ME; Jarvis, C; Krivit, W. Overwhelming sepsis following splenectomy for trauma. **The Journal of Pediatrics**, v.88, n.3, p.458-460, 1976.

Banani, SA. Partial desarterialization of the spleen in talassemia major. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 33, n.3, p.449-453, 1998.

Benjamin, JT; Komp, DM; Shaw, A; McMillan, CW. Alternatives to total splenectomy: Two cases reports. **Journal of Pediatric Surgery**, v.13, n.2, p.137-138, 1978.

Bradshaw, PH; Thomas, CG. Partial splenectomy and overwhelming infection in rats. **Journal of Surgical Research**, v.32, p.73-175, 1982.

Brandt, CT; Maciel, DT. Esplenose associada à esplenectomia em crianças esquistossomóticas: análise sequencial das imunoglobulinas G, A e M e dos componentes 3 e 4 do sistema de complemento. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.38, p.24-29, 1993.

Brandt, CT; Moraes F^o, JL, Maciel, DT; Miranda, P. Hepatosplenic mansonic schistosomiasis in children: lymphocyte subsets after splenectomy and autologous splenic transplantation. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.10, n.3, p.112-116, 1995.

Brandt, CT; Lopes, TL; Nogueira, JB; Oliveira, BS. Esquistossomose hépato-esplênica em crianças: corpúsculo de Howell-Jolly após esplenectomia e esplenose. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 41, n.2, p.100-104, 1996.

Brandt, CT; Castro, CMB; Santana, EM. Auto-implante esplênico em crianças esquistossomóticas submetidas a esplenectomia: avaliação das funções hemocaterética e imunológicas residuais. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 42, n.1, 3-12, 1997.

Brandt, CT; Araújo, LB; Castro, CMB; Santana, EM; Maciel, DT; Lopes, TL. Esplenose após esplenectomia e auto-implante esplênico em crianças portadoras de hepatoesplenomegalia esquistossomótica e varizes sangrantes do esôfago: atividade da tuftisina. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.43, n.1, p.37-40, 1998a.

Brandt, CT; Oliveira, BS; Nogueira, JBM; Neves, JR; Lopes, TL. Esquistossomose hepato-esplênica em crianças: avaliação morfológica e funcional após esplenectomia e auto-implante esplênico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.25, n.6, p. 339-402, 1998b.

Brandt, CT; Araújo, LB; Barbosa, CM: Autotransplantation of spleen tissue in children with schistosomiasis who underwent splenectomy: evaluation of splenic residual functions. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.13, n.4, p.212-216, 1998c.

Brandt, CT; Maciel, DT; Frei Caneca, AO; Castro, CMB; Araújo, LB: Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: Evaluation of splenic function after splenosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.117-122, 2001.

Brito, CF; Caldas, IR; Coura Filho, P; Correa-Oliveira, R; Oliveira, SC: CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in response to the recombinant 14 KDA schistosoma mansoni fatty acid-binding protein. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 51, n.6, p.595-601, 2000.

Browder, W; Kitahama, A; DiLuzio, NR. Modification of postsplenectomy sepsis followed by nonspecific immunostimulation. **Surgical Forum**, v.32, p.85-87, 1981.

Brown, RL; Irish, MS; McCabe, AJ; Glick, PL; Caty, MG. Observation of splenic trauma: when is a little too much? **Journal of Pediatric Surgery**, v.34, n.7, p.1124-1126, 1999.

Buchbinder, JH & Lipkoff, CJ. Splenosis: multiple peritoneal splenic implant following abdominal injury; a report of a case and review of the literature. **Surgery**, v.6, p.927-934, 1939.

Buyukunal, C; Danismend, N; Yeker, D. Spleen-saving procedures in pediatric splenic trauma. **British Journal of Surgery**, v.74, p.350-352, 1987.

Câmara, RD; Coelho, ARB. Reflexões sobre possíveis exageros na proteção aos animais utilizados em experimentação científica. Editorial. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 48, n.1, p.1-2, 2003.

Camarero, C; Eiras, P; Asensio, A; Leon, F Olivares, F; Escobar, H; Roy, G: Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry. **Acta Paediatrics**, v. 89, n.3, p.285-290, 2000.

Campos-Christo, M. Esplenectomias parciais regradas. Nota prévia sobre os três primeiros casos operados. **O Hospital**, v.56, n.4, p.93-97, 1959.

Campos-Christo, M. Segmental resections of the spleen. Report on the first eight cases operated on. **O Hospital**, v.62, n.3, p.187-204, 1962.

Capua Jr., A; Carneiro, JL; Rocha, JW. Hipertensão porta: esquistossomose - DAPE ou operação de Warren. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Boletim Informativo - Controvérsias, v.98, p.9-12, 1997.

Carneiro, PCA; Perrota, U; Ferreira, MAM; Jamel, N. Esplenectomia e predisposição às infecções. Aspectos clínicos e imunológicos. **A Folha Médica**, v.93, n.5-6, p.315-319, 1986.

Carneiro-Santos, P; Martins-Filho, O; Alves-Oliveira, LF; Silveira, AM; Coura-Filho, A; Vian, IR; Wilson, RA; Correa-Oliveira, R: Apoptosis: a mechanism of immuno regulation during human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunology**, v.22, n.6, p.267-277, 2000.

Chu, DZJ; Nishioka, K; El-Hagin, T; Hopfer, RL; Romsdahl, MM. Effects of tuftsin in postsplenectomy sepsis. **Surgery**, v.7, n.6, p.701-706, 1984.

Chusid, MJ. Pyogenic hepatic abscess in infancy and childhood. **Pediatrics**, v.62, n.4, p.554-559, 1978.

Coelho, RB. Lesões hepáticas secundárias. In: **Anatomia patológica das afecções hepáticas**. Editora Universitária da UFPE, Recife, 1971.

Colley, DG; Katz, N; Robrantes, W; Gazzinelli, G. Immune responses during human Schistosomiasis mansoni: T lymphocyte subsets analysis by monoclonal antibodies in hepatosplenic disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.22, p.297-302, 1982.

Constantopoulos, A; Najjar, VA: Tuftsin deficiency: a new syndrome with defective phagocytosis. **Journal of Pediatrics**, v.80, p.564-572, 1972.

Constantopoulos, A; Najjar, VA; Wish, JB; Necheles, TH; Stolbach, LL. Defective phagocytosis due to tuftsin deficiency in splenectomized subjects. **American Journal of Diseases of Children**, v.125, p.663-665, 1973.

Cooper, MR; DeChatelet, LR; Shirley, MS; Cooper, MR. Does tuftsin alter phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils?. **Inflammation**, v.6, n.1, p.103-112, 1982

Cooney, DR; Dearth, JC; Swanson, SE; Dewanjee, MK; Telander, RC. Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation and immunization in preventing postsplenectomy infection. **Surgery**, v.86, p.561-569, 1979.

Corrêa-Oliveira, R; Malaquias, LC; Falcão, PL; Viana, IR; Bahia-Oliveira, LM; Silveira, AM; Fraga, LA; Prata, A; Coffman, RL; Lambertucci, JR; Cunha-Melo, JR; Martins-Filho, OA; Wilson, RA; Gazzinelli, G. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.1, p.171-177, 1998.

Corry, JM; Polhil Jr, RB; Edmonds, SR; Johnston Jr, RB. Activity of the alternative complement pathway after splenectomy: comparison to activity in sickle cell disease and hypogammaglobulinemia. **The Journal of Pediatrics**, v.95, n.6, p.964-969, 1979.

Dajee, H; Buhr, AJ; Williams, CN; Hurley, EJ. Prevention of death of post splenectomy sepsis with levamisole and penicillin. **Current Surgery**, v.39, p.167-170, 1982.

Dickerman, JD; Horner, SR; Coil, JÁ; Gump, DW. The protective effect of intraperitoneal autotransplants in mice exposed to an aerolized suspension of type III *Streptococcus pneumoniae*. **Blood**, v.54, n.2, p.354-358, 1979.

Durig, M; Landerman, RMA; Harder, F. Lymphocyte subsets in human peripheral blood after splenectomy and autotransplantation of splenic tissue. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.104, p.110-115, 1984.

El-Cheikh, MC; Dutra, HS; Minóprio, P; Borojevic, R. Increase of B-lymphocyte number and activity during experimental murine schistosomiasis mansoni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1605-1607, 1997.

Ellison, EC; Fabri, PJ. Complications of splenectomy. Etiology, prevention and management. **Surgical Clinics of North America**, v.63, p.1313-1330, 1984.

Erf, GF; Bottje, WG; Bersi, TK; Headrick, MD; Fritts, CA: Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. **Poult Science**, v.77, n.4, p.529-537, 1998.

Erickson, WD; Burgert Jr, EO; Lynn, HB. The hazard of infection following splenectomy in children. **American Journal of Diseases of Children**, v.116, p.3-12, 1968.

Ferraz, AAB; Santos Junior, MA; Mathias, CAC; Magalhães, M; Bacelar, TS; Ferraz, EM. Modelo de peritonite experimental em camundongos esquistossomóticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.8, n.1, p.28-31, 1993.

Ferraz, AAB; Lopes, EPA; Bacelar, TS; Silveira, MJC; Silva, LMM; Ferraz, EM. Tratamento cirúrgico da hipertensão portal esquistossomótica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.27, p.332-337, 2000.

Ferraz, EM; Corrêa Lima, JF; Porfírio, L; Santos, DP; Kelner, S. Incidência de infecção em pacientes operados por patologia do aparelho digestivo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.6, p.255-260, 1979.

Ferraz, EM; Corrêa Lima, JF; Porfírio, L; Santos, DP; Kelner, S. Variação da incidência de infecção pós-operatória relacionada com o tipo de cirurgia executada. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.7, n.1, p.1-4, 1980a.

Ferraz, EM; Corrêa Lima, JF; Porfírio, L; Santos, DP; Kelner, S. Etiologia das infecções pós-operatórias do aparelho digestivo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.7, n.3, p.113-116, 1980b.

Ferraz, EM; Corrêa Lima, JF; Lima, FEA; Porfírio, L; Kelner, S. Infecção pós-operatória na esquistossomose hepatoesplênica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.9, n.1, p.1-4, 1982a.

Ferraz, EM. Infecção no paciente imunoincompetente. In: **Manual de Controle de Infecção em Cirurgia**, Cap 6, São Paulo, EPU, 1982b.

Ferraz, EM; Bacelar, TS; Ferraz, AAB; Pagnossin, G; Henriques Fº, GT ; Mariz, FN. Infecção de ferida pós-esplenectomia em pacientes com ou sem esquistossomose hepatoesplênica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.18, n.5/6, p.75-79, 1991.

Ferraz, EM; Bacelar, TS; Aguiar, JLA; Ferraz, AAB; Pagnossin, G; Batista, JE. Wound infection rates in clean surgery: a potentially misleading risk classification. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.13, n.8, p.457-462, 1992.

Fleming, CR; Dickson, ER; Harrison, EG. Splenosis: autotransplantation of splenic tissue. **The American Journal of Medicine**, v.61, p.414-419, 1976.

Franke, EL; Neu, HC. Postsplenectomy infection. **Surgical Clinics of North America**, v.61, n.1, p.155-167, 1981.

Freud, E; Cohen, IJ; Neuman, M; Mor, C; Zer, M. Should repeated partial splenectomy be attempted in patients with hematological diseases? Technical pitfalls and causes of failure in Gaucher's disease. **Journal of Pediatric Surgery**, v.32, n.9, p.1272-1276, 1997.

Gazzinelli, G; Lambertucci, JR; Katz, N; Rocha, RS; Lima, MS; Colley, DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. **Journal of Immunology**, v.135, p.2121-2127, 1985.

Gopal, V; Bisno, AL. Fulminant pneumococcal infections in "normal" asplenic hosts. **Archives of Internal Medicine**, v.137, p.1526-1530, 1977.

Graham, JG; Orr, JL. Hepatic abscess associated with visceral schistosomiasis. **The Lancet**, v.15, p.714-716, 1950.

Guerra, LC; Evangelista Neto, J; Miranda, JPC; Silveira, MJC; Brandt, CT; Kelner, S. Variações dos valores de séricos de IgG, IgA, IgM, C3 e C4 após esplenectomia em esquistossomóticos hepatoesplênicos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.6, p.123-127, 1991.

Hebert, JC; Gamelli, RL; Foster Jr, RS; Chalmer, BJ; Davis, JH. Improved survival after splenectomized and nonsplenectomized mice with *Corynebacterium parvum*. **Archives of Surgery**, v.118, p.328-331, 1983.

Holdsworth, RJ. Regeneration of the spleen and splenic autotransplantation. **British Journal of Surgery**, v.78, p.270-278, 1991.

Horton, J; Ogden, ME; Williams, S; Coln, D. The importance of splenic blood flow in clearing pneumococcal organisms. **Annals of Surgery**, v.195, n.2, p.172-176, 1982.

Hosea, SW; Brown, EJ; Berg, RA; Hamburger, MI; Frank, MM. Opsonic requirements for intravascular clearance after splenectomy. **The New England Journal of Medicine**, v.304, n.5, p.245-250, 1981a.

Hosea, SW; Burch, CG; Brown, EJ; Berg, RA; Frank, MM. Impaired immune response of splenectomized patients to polyvalent pneumococcal vaccine. **Lancet**, v.1, p.804-807, 1981b.

Idowu, O; Hayes-Jordan, A. Partial splenectomy in children under 4 years of age with hemoglobinopathy. **Journal of Pediatric Surgery**, v.33, n.8, p.1251-1253, 1998.

Jugenburg, M; Haddock, G; Freedman, MH; Ford-Jones, L; Ein, SH. The morbidity and mortality of pediatric splenectomy. **Journal of Pediatric Surgery**, v.34, n.7, p.1064-1067, 1999.

Junqueira, MIM; Tosta, CE; Prata, A. T cell dependent immunodepression in vivo in schistosoma infected patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, p.27-31, 1990

Kamel, R; Dunn, MA; Skelly, RR; Kamel, JÁ; Zayed, MG; Ramadan, M; Cahill, RA; El Maharakawy, S; Ismail, A; Ahmed, A. Clinical and immunological results of segmental splenectomy in schistosomiasis. **British Journal of Surgery**, v.73, p.544-547, 1986.

Katz, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.6, p.705-711, 1999.

Kelner, S; Ferraz, EM; Wanderley, E. Hematêmese: inquérito sobre desencadeamento por drogas contendo ácido acetilsalicílico na hipertensão porta esquistossomótica. **Faculdade de Medicina da Universidade do Recife**, v.24, p. 153-165, 1964.

Kelner, S. **Avaliação da esplenectomia e ligadura intraesofageana das varizes do esôfago na esquistossomose mansônica**. Tese para Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife. Recife, 1965.

Kelner, S; Ferreira, PR; Dantas, A: Ligadura de varizes esôfago-gástricas na hipertensão porta esquistossomótica: evolução de 25 anos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.9, p.140-146, 1982.

Kelner, S. Critical evaluation of surgical treatment of schistosomotic portal hypertension. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.4, p.357-368, 1992.

Kelner, S; Silveira, MJC. História natural das varizes de esôfago na esquistossomose mansônica hépatoesplênica. In__**Varizes de esôfago na esquistossomose mansônica**. Recife, Ed. Universitária da UFPE, 1997.

Kimber, C; Spitz, L; Drake, E; Westaby, S; Cozzi, F; Pierro, A. Elective partial splenectomy in childhood. **Journal of Pediatric Surgery**, v.33, n.6, p.826-829, 1998.

King, H; Schumaker, HB. Splenic studies. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Annals of Surgery**, v.136, p.239-242, 1952.

Lacerda, CM. **Alterações angiográficas e pressóricas determinadas pela esplenectomia e ligadura interna das varizes de esôfago na esquistossomose mansônica**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991, 174p.

Lacerda, CM; Evangelhista Neto, J; Melo, PSV. Hemorragia por varizes esofágicas: aspectos atuais. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.45, p.57-68, 2000.

Lacerda, CM; Freire, W; Vieira de Melo, PS; Lacerda, HR; Carvalho, GL. Splenectomy and ligation of the left gastric vein in schistosomiasis mansoni: the effect on esophageal varicea pressure measured by a non-invasive technique. **Keio Journal of Medicine**, v.51, n.2, p.89-92, 2002.

Lambertucci, JR; Teixeira, R; Navarro, MMM; Coelho, PMZ; Ferreira, MD. Liver abscess and acute schistosomiasis. A new association. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.23, p.239-240, 1990.

Lambertucci, JR. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therepeutic features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.399-404, 1993.

Lambertucci, JR; Rayes, AA; Barata, CH; Teixeira, R; Gerspacher-Lara, R. Acute schistosomiasis: report on five singular cases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.5, p.631-635, 1997.

Lambertucci, JR; Rayes, AA; Serufo, JC; Gerspacher-Lara, R; Brasileiro F, G; Teixeira, R; Antunes, CM; Goes, AM; Coelho, PMZ. Schistosomiasis and associated infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.1, p.135-139, 1998.

Leemans, R; Harms, G; Rijkers, GT; Timens, W. Splenic autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. **Clinical and Experimental Immunology**, v.117, p.596-604, 1999a.

Leemans, R; Manson, W; Snijder, JAM; Smit, JW; Klasen, HK; Hauw, T; Timens, W. Immune response capacity after human splenic autotransplantation. Restoration of response to individual pneumococcal vaccine subtypes. **Annals of Surgery**, v.229, n.2, p.279-285, 1999b.

Leitner, W; Bergmann, ES; Thalhamer, J. Regeneration of splenic stromal elements. **Research in Experimental Medicine**, v.194, p.221-230, 1994.

Likhite, VV. Opsonin and leukofilic ? globulin in chronically splectomized rats with and without heterotropic autotransplanted splenic tissue. **Nature**, v.253, p.742-743, 1975.

Liu, DL; Xia, S; Tang, J; Qin, X; Liu, H. Allograft transplantation of whole spleen in patients with hepatic malignant tumors or hemophilia A. Operative technique and preliminary results. **Archives of Surgery**, v.130, p.33-39, 1995.

Lucas, CE. Splenic trauma. Choice of management. **Annals of Surgery**, v.213, p.98-112, 1991.

Magalhães-Filho, A & Coutinho-Abath, E. Splenic reactions in swiss albino mice to single and multiple infections with *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.10, n.3, p.356-364, 1991.

Manley, OT; Marine, D. The transplantation of splenic tissue into the subcutaneous fascia of the abdomen in rabbits. **Journal of Experimental Medicine**, v.25, p.619-627, 1917.

Marques, RG; Petroianu, A. Infecção fulminante pós-esplenectomia. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.40, n.1, p.13, 2003.

Martins-Filho, OA; Cunha-Melo, JR; Corrêa-Oliveira, R. The spleen is an important site of T cell activation during human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.1, p.159-164, 1998.

Martins-Filho, OA; Cunha-Melo, JR; Lambertucci, JR; Silveira, AM; Colley, D; Gazzinelli, G; Corrêa-Oliveira, R. Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. **Digestive Diseases and Sciences**, v.44, n.3, p.570-577, 1999.

Martins Torres, OJ; Dietz, UA; Lima, EJ; Loddio, G; Salazar, RM; Malafaia, O. Histological evaluation of the regeneration of splenic autotransplants. Experimental study in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.9, n.2, p.81-87, 1994.

McClusky, DA; Skandalakis, LJ; Colborn, GL; Skandalakis, JE. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery – part I. **World Journal of Surgery**, v.23, n.3, p.311-325, 1999a.

McClusky, DA; Skandalakis, LJ; Colborn, GL; Skandalakis, JE. Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery – part II. **World Journal of Surgery**, v.23, n.5, p.514-526, 1999b.

Mikulsky, SM; Von Hoff, DD; Rozenzweig, M; Muggia, FM. Tuftsin – unimportant or forgotten? **The New England Journal of Medicine**, v.296, p.454, 1977.

Millikan, JS; Moore, EE; Moore, GE; Stevens, RE. Alternatives to splenectomy in adults after trauma. Repair, partial resection and reimplantation of splenic tissue. **The American Journal of Surgery**, v.144, p.711-716, 1982.

Moore, FA; Moore, EE; Moore, GE, Milikan, JS. Risk of splenic salvage after trauma: analysis of 200 adults. **American Journal of Surgery**, v.148, p.800-805, 1984.

Morgenstern, L; Shapiro, SJ. Technics of splenic conservation. **Archives of Surgery**, v.114, p.449-454, 1979.

Morris, DH; Bullock, FD. The importance of the spleen in resistance to infection. **Annals of Surgery**, v.70, n.5, p.513-521, 1919.

Naim, JO; Desiderio, DM; Trimble, J; Hinshaw, JR. The identification of serum tuftsin by reverse-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.164, p.221-226, 1987.

Najjar, VA. Biological and biochemical characteristics of the tetrapeptide tuftisin, Thr-Lys-Pro-Arg. **Advanced Experimental Medicine and Biology**, v.12, p.131-147, 1979.

Najjar, VA. Tuftisin, a natural activator of phagocytosis: an overview. **Annals of New York Academy of Science**, p.419:1-11, 1983.

Najjar, VA; Constantopoulos, A. A new phagocytosis-stimulating tetrapeptide hormone, tuftisin, and its role in disease. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v.12, p.197-215, 1972.

Najjar, VA; Fidalgo, BV; Sttit, E. The physiological role of the lymphoid system. The appearance of leukokinin activity after splenectomy. **Biochemistry**, v.7, p.2376-2379, 1968.

Najjar, VA; Nishioka, K. Tuftisin: a natural phagocytosis stimulating peptide. **Nature**, v.228, p.672-673, 1970.

Nishioka, K; Satoh, PS; Constantopoulos, A; Najjar, VA. The chemical synthesis of phagocytosis-stimulating tetrapeptide tuftsin and its biological properties. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.310, p.230-237, 1973.

Nishioka, K; Wagle, JR; Minter, AM; Rodriguez, TJr; Dessens, SE. Tuftsin-enhanced thymidine incorporation by murine splenic monocytes. **International Journal of Immunopharmacology**, v.12, n.8, p.905-908, 1990.

Nishioka, K; Wagle, JR; Rodriguez, TJr; Maeta, M; Kubo, S; Dessens, SE. Studies of human granulocyte phagocytosis stimulation by tuftsin. **Journal of Surgical Research**, v.56, p.94-101, 1994.

Nishioka, K; Hurr, KJ; Dessens, SE; Rodriguez, TJr. A comparative study of [Leu1] tuftsin and tuftsin, a natural phagocytosis-stimulating peptide. **International Journal of Immunopharmacology**, v.23, n.5-6, p.627-630, 1991.

O'Donnell, FJ. The value of splenectomy in Banti's disease. **The British Medical Journal**, p.854, 1929.

O'Neal, BJ; Mc Donald,JC. The risk of sepsis in the asplenic adult. **Annals of Surgery**, v.194, n.6, p.775-778, 1981.

Orda, R; Barak, J; Baron, J; Spirer, Z; Wiznitzer, T. Postsplenectomy splenic activity. **Annals of Surgery**, v.194, n.6, p.771-774, 1981.

Ottens, H; Dickerson, G. Studies on the effects of bacteria on experimental schistosome infections in animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.85-107, 1972.

Patel, JM; Williams, JS; Shmigel, B; Hinshaw, JR. Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. **Surgery**, v.90, n.4, p.683-688, 1981.

Patel, JM; Williams, JS; Naim, JO; Hinshaw, JR. Protection against pneumococcal sepsis in splenectomized rats by implantation of splenic tissue into an omental pouch. **Surgery**, v.91, n.6, p.638-641, 1982.

Patel, JM; Williams, JS; Naim, JO; Hinshaw, JR. The effect of site and technique of splenic tissue reimplantation on pneumococcal clearance from the body. **Journal of Pediatric Surgery**, v.2110, p.877-880, 1986.

Pearson, HÁ; Johnston, D; Smith, KA; Touloukian, RJ. The born-again spleen. Return of splenic function after splenectomy for trauma. **The New England Journal of Medicine**, v.25, p.1389-1392, 1978.

Pegg, CAS, Norman, JC. Intraportal spleen cell autotransplantation. **Surgery**, v.69, n.3, p.433-440, 1971.

Pellegrino, J & Macedo, DG. A simplified method for the concentration of cercariae. **Journal of Parasitology**, v.41, p.329-330, 1955.

Perla, D. The regeneration of autoplasic splenic transplant. **American Journal of Pathology**, v.12, p.665-675, 1936.

Petroianu, A & Barbosa, AJA. Quantitative studies on macrophage phagocytosis in whole spleen and the remnant of subtotal splenectomy. **Medical Sciences Research**, v.19, p.373-375, 1991.

Petroianu, A. **Estudo quantitativo da função fagocitária de macrófagos em baços íntegros e em remanescentes de esplenectomia subtotal, em mamíferos.** Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1993a, 118 p.

Petroianu, A. Esplenectomia subtotal preservando o pólo superior suprido pelos vasos esplenogástricos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.21, n.1, p.21-26, 1993b.

Petroianu, A. Subtotal splenectomy and portal variceal disconnection in the treatment of portal hypertension. **Canadian Journal of Surgery**, v.36, n.3, p.251-254, 1993c.

Petroianu, A; Antunes, LJ. Immune profiles in hepatosplenic schistosomiasis mansoni after surgical treatments. **Journal of Internal Medicine Research**, v. 26, n.1, p.43-49, 1997.

Petroianu, A. Aspectos éticos da pesquisa em cirurgia. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Boletim Informativo - Opinião, v.111, p.45-48, 2001.

Phillips, JH; Babcock, GF; Nishioka, K. Tuftsin. a naturally occurring immunopotentiating factor. *In vitro* enhancement of murine natural cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunology**, v.126, p.915-921, 1981.

Pisters, PWT; Pachter, HL. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. **Annals of Surgery**, v.219, p.225-235, 1994.

Rabelo, GD; Abrantes, WL; Drumond, DAF. Esplenectomia *versus* cirurgia conservadora no trauma esplênico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.18, n.3, p.80-86, 1991.

Raia, S; Mies, S; Alfieri Júnior, F. Portal hypertension in schistosomiasis. **World Journal of Surgery**, v.15, p.176-187, 1991.

Raia, S. Prefácio. In__Kelner, S & Silveira, M. **Varizes de esôfago na esquistossomose mansônica**. Recife, Ed. Universitária da UFPE, 1997.

Resende, V; Petroianu, A. Funções do remanescente esplênico na esplenectomia subtotal para o tratamento de lesões complexas do baço. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.48, n.1, p.26-31, 2002.

Ricci, G; Presani, G; Guaschino, S; Simeoni, R; Perticarari, S. Leucocyte detection in human semen using flow cytometry. **Human Reproduction**, v.15, n.6, p.1329-1337, 2000.

Rice, HM; James, PD. Ectopic splenic tissue failed to prevent fatal pneumococcal septicemia after splenectomy for trauma. **The Lancet**, v.15, p.565-566, 1980.

Rocha, JW. Hipertensão porta: esquistossomose - DAPE ou operação de Warren. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Boletim Informativo - Controvérsias, v.98, p.11-12, 1997.

Rodrigues, AZ; Nigro, AJT; Paiva, ER; Sementelli, A; Tavares, NM. Estudo comparativo da viabilidade de fragmento de tecido esplênico autólogo implantado no omento maior ou na tela subcutânea de ratas. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.6, n.2, p.64-7, 1991.

Rosner, F. The spleen in the Talmud and other Early Jewish Writings. **Bulletins of History of Medicine**, v.46, p.82-86, 1972.

Sandstrom, K; Hakansson, L; Lukinius, A; Venge, P. A method to study apoptosis in eosinophils by flow cytometry. **Journal of Immunologic Methods**, v.240, n.1-2, p.55-68, 2000.

Salviano Filho, P; . Abscesso hepático. Experiência do HSE em 25 anos e revisão da literatura brasileira. **Revista Médica do HSE**, v.25, p.299-331, 1973.

Santos, OC; Silveira, M; Figueredo, J; Montenegro, L; Brandt, CT; Evangelista, J; Meira, M; Kelner, S. Mapeamento linfocitário imunohistoquímico no folículo de baços em esquistossomóticos hepato-esplênicos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.80, Suppl.I p.80, 1991.

Schwartz, AD; Goldthorn, JF; Winkelstein, JÁ; Swift, AJ. Lack of protective effect of autotransplanted splenic tissue to pneumococcal challenge. **Blood**, v.51, n.3, p.475-478, 1978.

Schwartz, PE; Sterioff, S; Mucha, P; Melton III, LJ; Offord, PO. Postsplenectomy sepsis and mortality in adults. **Journal of the American Medical Association**, v.248, p.2279-2283, 1982.

Shinefield, HR; Steinberg, CR; Kaye, D. Effect of splenectomy on the susceptibility of mice inoculated with *Diplococcus pneumoniae*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 123 p.777-794, 1966.

Siddiqui, MZ; Sharma, AK; Kumar, S; Kumar, A; Bhat, PN. Single-step bulk purification of synthetic terapeptide tufts in by high performance liquid chromatography. **Indian Journal of Bichemics and Biophysics**, v.32, n.1, p.55-59, 1995.

Silveira, MJC; Vanderley, MI; Kelner, S. Avaliação nutricional e imunológica em pacientes candidatos a cirurgia do aparelho digestivo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.14, n.3/4, p.133-141, 1987.

Silveira, RK. Cirurgião acadêmico: ciência e arte. Tributo ao Professor Salomão Kelner (Editorial). *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.17, n.1, p.4-5, 2001.

Singer, DB. Postsplenectomy sepsis. *In*: Rosenberg, HS & Bolander, RP. **Perspectives in pediatric pathology**. Chicago, Year Book Medical Publishers, p 285-305, 1973.

Smith, E; De Young, N; Drew, PA. Immune cell subpopulations in regenerated splenic tissue in rats. Abstract. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v.69, n.7, p.522, 1999.

Solheim, K. Non-operative management of splenic rupture. **Acta Chirurgica of Scandinavia**, v.145, p.55-58, 1979.

Spath-Schwalbe, E; Flath, B; Kaufmann, O; Thiel, G; Brinckmann, R; Dietel, M; Possinger, K. An unusual case of leukemic non-Hodgkin lymphoma with blastic transformation. **Annals of Hematology**, v.79, n.4, p.217-221, 2000.

Spirer, Z; Zakuth, V; Bogair, N; Fridkin, M. Radioimmunoassay of the phagocytosis-stimulating tetrapeptide tuftisin in normal and splenectomized subjects. **European Journal of Immunology**, v.7, p.69-74, 1977a.

Spirer, Z; Zakuth, V; Diamant, S; Mondorf, W; Stefanescu, Y; Fridkin, M. Decreased tuftisin concentrations in patients who have undergone splenectomy. **British Medical Journal**, v.2, p.1574-1576, 1977b.

Spirer, Z; Zakuth, V; Orda, R; Wiznitzer, T; Mondorf, W. Stefanescu, Y; Fridkin, M. Acquired tuftisin deficiency. **Annals of New York Academy of Science**, v.419, p.220-226, 1983.

Standage, BA; Goss, JC. Outcome and sepsis after splenectomy in adults. **The American Journal of Surgery**, v.143, p.545-548, 1982

Steely, WM; Satava, RM; Brigham, RA; Setser, ER; Davies, RS. Splenic autotransplantation: determinants of optimum amount required for maximum survival. **Journal of Surgical Research**, v.45, p.327-332, 1988.

Szendroi, T; Hajdu, Z; Miko, I; Bagyo, J; Bokk, A; Barnak, G. Autologous spleen transplantation. **Orv Hetil**, v.134, n.3, p.125-128, 1993.

Tavassoli, M; Ratzan, RJ; Crosby, WH. Studies on regeneration of heterotopic splenic autotransplants. **Blood**, v.41, n.5, 1973.

Teixeira, R; Coelho, PMZ; Brasileiro F^o, G; Azevedo Jr, GM; Lambertucci, JR. Pyogenic liver abscess and acute schistosomiasis mansoni: report on 3 cases and experimental study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, n.3, p.280-283, 1996.

Teixeira, R. **Aspectos patogênicos da associação entre o abscesso piogênico do fígado e a esquistossomose mansoni experimental**. Tese de Doutorado, UFMG, Belo Horizonte, 1997, 160p.

Tesluk, GC; Thomas, CG. Prevention of postsplenectomy pneumococcal sepsis in rats. **Surgery Forum**, v.30, p.35-37, 1979.

Torres, OJM; Dietz, UA; Blun Lima, J; Lodo, J; Salazar; Malafaia, O. Histological evaluation of the regeneration of splenic autotransplants. Experimental study in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.9, p.81-87, 1994.

Vaezy, S; Martin, R; Keilman, G; Kaezowsky, P; Chi, E; Yazaji, E; Caps, M; Poliachik, S; Carter, S; Sharar, S; Cornejo, C; Crum, L. Control of splenic bleeding by using high intensity ultrasound. **The Journal of Trauma**, v.47, n.3, p. 521-525, 1999.

Van Wyck, DB; Witte, MH; Witte, Cl; Thies, AC. Critical splenic mass for survival from experimental pneumococemia. **Journal of Surgical Research**, v.28, p.14-17, 1980.

Vega, A; Howell, C; Krasna, I; Campos, J; Heyman, S; Ziegler, M; Koop, CE. Splenic autotransplantation: optimal functional factors. **Journal of Pediatric Surgery**, v.16, n.6, p.898-904, 1981.

Viana, IRC. **Imunidade à esquistossomose mansoni em indivíduos residentes em área endêmica: relação entre resistência à infecção e respostas celular e humoral**. Tese de Doutorado, FIOCRUZ, Belo Horizonte, 1997, 64p.

Westermann, J; Willführ, KU; Pabst, R. Influence of donor and host age on the regeneration and blood flow of splenic transplants. **Journal of Pediatric Surgery**, v.23, n.9, p.835-838, 1988.

Westermann, J; Schwinzer, R; Jecker, P; Pabst, R. Lymphocyte subsets in the blood. The influence of splenectomy, splenic autotransplantation, ageing and the site of blood sampling on the number of B, T, CD4+ and CD8+ lymphocytes in the rat. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.31, p.1207-1212, 1990.

Westermann, J; Pabst, R. Autotransplantation of the spleen in the rat: donor leukocytes of the spleen fragment survive implantation to migrate and proliferate in the host. **Cell Tissue Research**, v.287, n.2, p.357-364, 1997.

Willführ, KU; Westermann, J; Pabst, R. Splenic autotransplantation provides protection against fatal sepsis in young but not in old rats. **Journal of Pediatric Surgery**, v.27, n.9, p.1207-1212, 1992.

Zappalá, A. **Estudo anatômico da divisão terminal da artéria lienal**. Tese de Docência Livre de Anatomia da Faculdade de Medicina da UFMG, Minas Gerais, 1958, 136 p.

Zappalá, A. **Contribuição para o estudo da anatomia dos vasos e das zonas vasculares lienais**. Tese de Professor Catedrático de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Recife, Recife, 1959, 180 p.

Zhang, Y; Ma, H; Cai, Z. Serum tuftsin concentration as an indicator of postoperative splenic function after spleen-preserving surgery. **Chung Hua Wai Ko Tsa China**, v.34, n.8, p.479-481, 1996.

Zoli, G; Corazza, GR; D'Amato, G; Bartoli, R; Baldoni, F; Gasbarrini, G. Splenic autotransplantation after splenectomy: tuftsin activity correlates with residual splenic function. **British Journal of Surgery**, v.81, p.716-718, 1994.