

PATOLOGIA DO BAÇO NA ESQUISTOSSOMOSE HEPATESPLÊNICA

Zilton A. ANDRADE (1) e Sônia G. ANDRADE (2)

RESUMO

Foi realizado estudo morfológico de baços retirados cirurgicamente de pacientes com a forma hepatesplênica da esquistossomose, tendo-se empregado métodos histológicos, histoquímicos, imunocitoquímicos e injeções vasculares. Tais métodos permitiram evidenciar que: a) há mais células retículo-endoteliais nas polpas vermelha e branca do que o avaliado com o auxílio de métodos clássicos; b) células fusiformes, confundíveis com fibroblastos, revelaram natureza retículo-endotelial, histoquimicamente, enquanto a proliferação fibroblástica esteve ausente e a fibrose foi achado excepcional, ao contrário do que se tem afirmado em trabalhos anteriores; c) foi freqüente o encontro de focos plasmocitários, com secreção intracitoplasmática de glicoproteínas e síntese de gamaglobulina. Estes achados refletem o profundo comprometimento do sistema retículo-endotelial do baço na esplenomegalia da esquistossomose e revelam a importância do fator celular em sua patogenia.

Os aspectos congestivos estiveram presentes em todos os casos. Foi verificado que os seios venosos, distendidos e de paredes espessadas, parecem funcionar como vênulas, permitindo a passagem rápida e talvez a transmissão da pressão, do setor arterial para o venoso.

INTRODUÇÃO

A esplenomegalia é um achado freqüente e às vezes dominante na esquistossomose, mas sua patogenia, significado, conseqüências e mesmo sua morfologia ainda carecem de dados mais precisos. A investigação morfológica, feita quase sempre com métodos histológicos clássicos, embora tenha trazido valiosa contribuição, ainda não foi suficiente para elucidar a verdadeira natureza das reações celulares esplênicas. Estudos mais antigos, de MC MICHAEL²¹ e MENON²⁵ a respeito da chamada "síndrome de Banti" indicaram que dois fatores, a hiperplasia celular e a hipertensão venosa, eram responsáveis pela esplenomegalia. Mais recentemente,

Autores americanos^{9, 26, 29} têm concluído que a hipertensão portal é o fator determinante da "esplenomegalia congestiva". No Brasil tal tipo de esplenomegalia está quase sempre associado a esquistossomose e os Autores nacionais têm sido unânimes em indicar a importância conjugada da hipertensão portal e da hiperplasia retículo-endotelial na patogênese da mesma. Tem sido observado que a esplenomegalia na esquistossomose pode surgir antes da instalação da hipertensão portal²², que não há correlação entre o peso do baço e o grau de hipertensão portal²² e que há acentuação da esplenomegalia em animais com infecção repetida¹⁹. Métodos

Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas. Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Prof. Edgard Santos, da Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia, Salvador, Brasil

(1) Chefe do Serviço e Livre-Docente

(2) Assistente de Pesquisas

histoquímicos e imunocitoquímicos permitiram verificar que o aumento do baço de camundongos infetados pelo *S. mansoni* se deve inicialmente a uma estimulação antigênica do tecido linfo-reticular, os aspectos congestivos aparecendo tardiamente³. Mas, se estes fatos indicam a importância do fator celular, por outro lado põem em relevo o desconhecimento que temos da sua exata natureza e do seu comportamento em presença da hipertensão venosa, principalmente em referência à doença humana. Numa tentativa de contribuir para o esclarecimento desses aspectos, fizemos no presente trabalho uma investigação morfológica em baços humanos obtidos através esplenectomia em indivíduos com a forma hepatoesplênica da esquistossomose.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados relativos a 318 casos de esplenomegalia da esquistossomose submetidos a esplenectomia foram revistos e as secções histológicas destes casos, coradas rotineiramente, foram reexaminadas.

Trinta e dois baços, recebidos logo após a operação, foram submetidos, parcial ou totalmente, à seguinte rotina: após estudo macroscópico detalhado, os fragmentos de tecido esplênico foram fixados em formol neutro a 10%, em líquido de Bouin ou Zenker e incluídos em parafina. As secções obtidas foram submetidas aos seguintes métodos de coloração: hematoxilina-eosina, tricrômico de Gomori, hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, Weigert-van Gieson para fibras colágenas e elásticas, Weigert para fibrina, reticulina de Gomori, P.A.S. e azul de toluidina. Foram também utilizados os métodos de Perls para ferro e de van Kossa para cálcio. Material fixado em formol a 10%, em cloreto de cálcio a 3% e cortado em congelação foi submetido ao método de HADLER¹³ para impregnação argêntica das células reticulares.

Para o estudo da basofilia citoplasmática, pequenos fragmentos foram fixados em líquido de Carnoy e as secções em parafina foram coradas através técnica com verde metila-pironina³¹.

Pequenas porções do baço foram também fixadas em formol a 10%, em 1% de cloreto de cálcio, pH 7,2 a 4°C, durante 24

horas e os cortes por congelação foram tratados por método diazônico para fosfatase ácida⁶, bem como por método semelhante para esterase não específica¹⁰.

Para estudo imunocitoquímico pequenos fragmentos foram colocados diretamente no interior de um criostato (-20°C) onde foram seccionados. As secções de 6 μ de espessura foram depois fixadas em acetona desidratada, lavadas em salina neutra tamponada e postas em contato com anti-gamaglobulina humana fluoresceïnada. Secções controle tratadas por anti-soros fluoresceïnados não específicos ou por soros não fluoresceïnados foram também utilizadas. A anti-gamaglobulina fluoresceïnada foi obtida comercialmente do Baltimore Laboratory Co. e duas vezes adsorvida com pó de fígado de rato imediatamente antes do uso. As lâminas montadas em glicerina tamponada foram examinadas em microscópio Zeiss com lâmpada de luz ultra-violeta Osram 200, com filtros excitadores 2BG 12 e filtros protetores OG 5. As fotografias foram tomadas com filme "high speed" Ektachrome.

As injeções vasculares foram feitas através da veia ou da artéria esplênica ou das duas ao mesmo tempo, com seringa de 20 ml sem controle de pressão. Foram feitas injeções com gelatina corada e, após fixação do órgão, foram feitos cortes por congelação de cerca de 20 a 50 μ de espessura, corados ligeiramente pela hematoxilina. Em alguns casos utilizou-se solução de acetato de vinilite a 14,0% em acetona em lugar da gelatina. Os órgãos assim injetados foram em seguida postos em ácido clorídrico concentrado por vários dias para a obtenção de modelos vasculares plásticos.

Para o estudo das alterações vasculares também foram utilizados cortes em série, com 5 μ de espessura, corados pelo método de Weigert-van Gieson, em material previamente injetado com gelatina corada ou não.

RESULTADOS

Os baços mostravam sensível aumento de peso, como pode ser observado no Quadro I. Microscopicamente, os cordões esplênicos eram ricos em células que apresentavam forte atividade fosfatásica ácida no citoplasma, as quais eram maiores e mais fortemente

QUADRO I

Esplenomegalia da esquistossomose (pesos dos baços e distribuição dos grupos etários em 350 casos estudados)

Grupos etários	Sexos		Pesos dos baços (g)		
	Masculino	Feminino	Máximo	Mínimo	Média
10 anos	1	1	550	520	535
10 a 20 anos	63	38	3.200	300	980
21 a 30 anos	63	85	2.400	300	1.300
31 a 40 anos	29	23	2.650	450	1.100
41 a 50 anos	10	24	2.500	480	1.100
51 a 60 anos	8	4	3.300	400	1.000
+ 60 anos	—	1	860	—	—
Total	174	176			

coradas ao nível da polpa branca. Tais células exibiam aspecto estrelado, com finas ramificações citoplasmáticas, o que lhes comunicavam aspecto aracneiforme. A atividade fosfatásica se evidenciava sob a forma de pequenos grãos vermelho-escuros que tendiam a confluír, não havendo coloração nuclear. Em virtude do grande número de células reticulares nos cordões esplênicos, êstes se apresentavam escuros, com células fosfatase-positivas delimitando os seios venosos dilatados e vazios (Fig. 1). No interior das traves e trabéculas estas células não eram observadas, mas formavam uma fileira na periferia destas estruturas. Nos folículos linfóides elas se distribuíam na parte central em relação com a adventícia da arteriola centrofolicular e em camadas concêntricas na zona periférica, deixando um halo na porção intermediária do folículo. Com a coloração para esterase não específica, o aspecto era semelhante, porém a coloração era mais intensa e difusa em vez de granular (Fig. 2). A impregnação argêntica pelo método de Hadler deu resultados inconstantes, além de impregnar fracamente as células centronodulares. Todavia, as células do retículo esplênico apareciam bem individualizadas, assim como aquelas que revestiam os seios venosos (Fig. 3). Em tôrno de arteriolas, as células argentófilas formavam rede bem nítida.

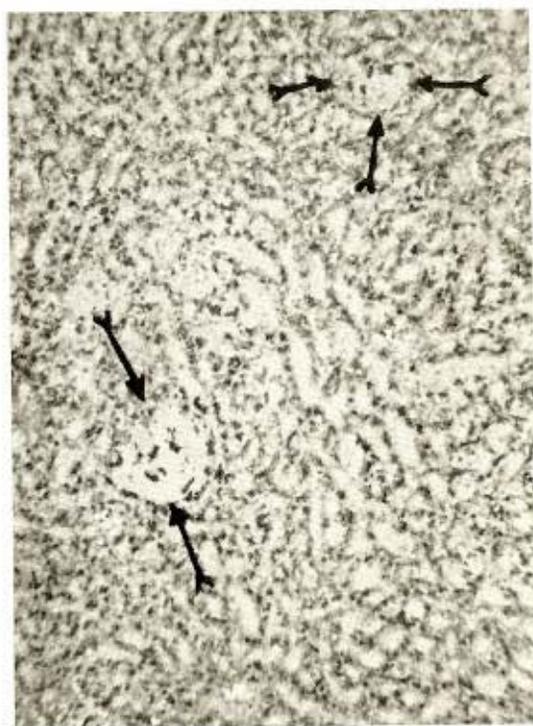


Fig. 1 — Presença de intensa atividade fosfatásica ácida no citoplasma de células reticulares na polpa esplênica, as quais aparecem delimitando os seios venosos. As setas indicam dois folículos linfóides atrofiados, com células reticulares mais fortemente coradas. Método de BARKA para fosfatase ácida. Tempo de incubação 15 minutos. (120x)



Fig. 2 — Células reticulares com atividade esterática dispostas em torno de arteriolo foliolar. As estas células são mais numerosas que no baço normal e mais intensamente coradas, sendo maiores que as que se vêem nos cordões esplênicos nesta mesma fotografia. Tal fato talvez demonstre que, enquanto estas últimas células modificam pouco a sua forma, as células centronodulares mostram maior reatividade. Método de DAVIS para esterase não específica. Tempo de incubação 5 minutos. (150×)



Fig. 3 — Células argentófilas dispostas principalmente no revestimento dos seios venosos. Esta foto serve para comparação com os aspectos obtidos com os métodos histoquímicos, todos demonstrando a grande quantidade de células reticulares na esplenomegalia "congestiva". Método de HADLER. (200×)

A presença de pigmento no citoplasma das células reticulares, que podia ser melhor observado nas lâminas não coradas, bem como as evidências de leuco ou eritrofagocitose, foram aspectos pouco frequentes e de pequena intensidade. O pigmento não dava reação para ferro ou cálcio, nem se corava pelo método do P.A.S.

Apenas excepcionalmente pôde ser comprovada a presença de feixes colágenos nos cordões esplênicos. A proliferação fibroblástica não foi vista em nenhum caso. A trama reticular se tornava às vezes mais densa pela proliferação de novas fibrilas ou após colapso em áreas focais. Nestas áreas as fibrilas podiam exibir características pré-colágenas. A membrana fenestrada, que delimita e sustenta os seios venosos, não apresen-

tava alterações evidentes. Pelo método de van Gieson, os cordões esplênicos mostravam difusa coloração avermelhada, mas não havia diferenciação de fibras. O aparecimento de feixes colágenos se fazia em torno de arteriolas (fibrose adventicial), como seqüelas de focos hemorrágicos e sob a forma de laminações concêntricas na periferia de alguns folículos linfóides. Não havia aumento de fibras elásticas nos cordões esplênicos. De permeio com as células reticulares da polpa vermelha aparecia número variável de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, polimorfonucleares e ocasionais mastócitos. Focos de mielopoiese foram observados frequentemente, embora em nenhum caso tenham assumido proeminência no quadro histológico. Os plasmócitos, com vários graus de

diferenciação, apareciam em número variável, sendo, em alguns casos, bastante numerosos. Em algumas áreas focais surgiam muitas células de núcleo central, com citoplasma amplo e pironinofílico ao lado de plasmócitos maduros ("focos de plasmocitogênese"). Células com material P.A.S. positivo no citoplasma também podiam ser evidenciadas nestas áreas. A técnica de Coons com anticorpos fluorescentes mostrava a presença de gamaglobulina no citoplasma de várias células esparsas na polpa vermelha ou agrupadas nos "focos de plasmocitogênese" (Fig. 4).

O material se tornava fluorescente quando tratado por uma anti-gamaglobulina humana fluoresceïnada, não exibia autofluorescência, nem ficava fluorescente quando tratado com sêro fluoresceïnado não específico. Era na maior parte de localização extracelular, de aspecto grumoso ou nodular (Fig. 5B). A presença de material hialino nos folículos linfóides em raros casos se acompanhava de reação granulomatosa, de tipo sarcóide (Fig. 5C). Também graus variáveis de substituição fibrosa foram observados em folículos que, concomitantemente, mostravam deposição intersticial de material hialino.

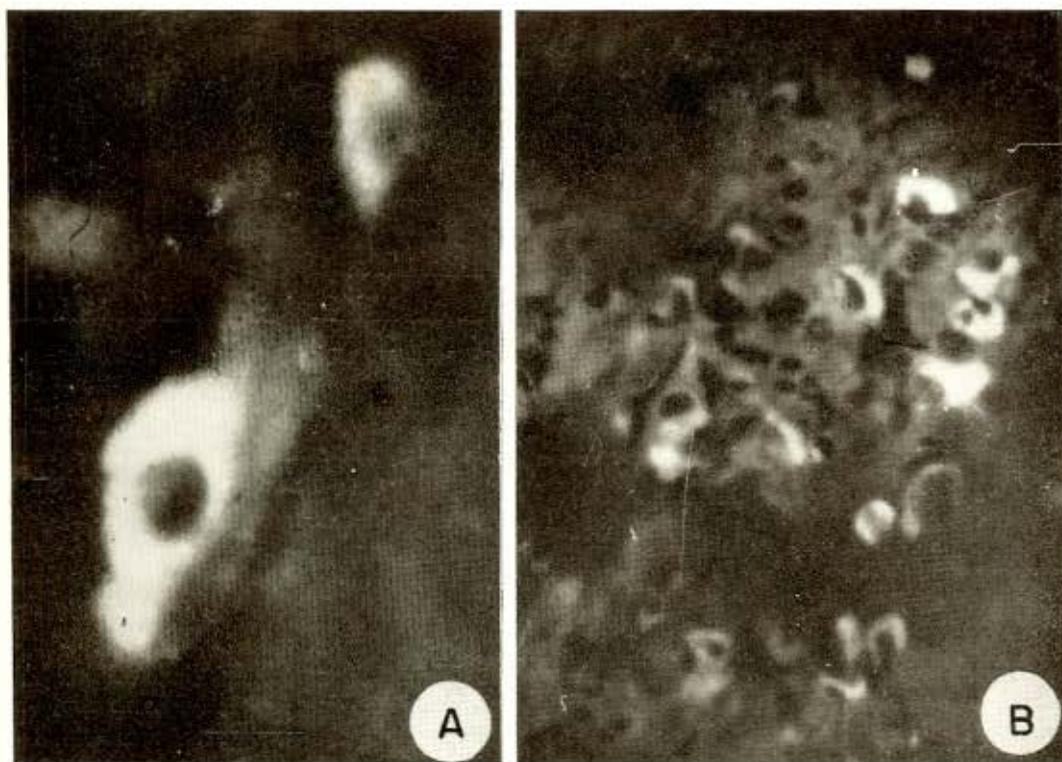


Fig. 4 — Plasmocitogênese em plasmócitos, exibindo fluorescência específica para gamaglobulina humana. Método de Coons, com anti-gamaglobulina humana fluoresceïnada. (450 \times e 200 \times)

A polpa branca mostrava graus variáveis de alterações que iam desde a hiperplasia até a atrofia. De modo geral, os pacientes mais jovens mostravam folículos linfóides com centros germinativos hiperplásticos. No centro de alguns folículos linfóides havia acúmulo de material homogêneo eosinófilo (Fig. 5A), o qual era P.A.S. positivo e não dava metacromasia pelo azul de toluidina.

Observou-se freqüentemente a presença de focos hemorrágicos de várias idades em torno das arteríolas penicilares do baço, por vezes circundando ou infiltrando folículos linfóides. Nas hemorragias mais antigas havia deposição de filamentos septados, com reação granulomatosa tipo corpo estranho. Nestas áreas hemorrágicas a reação de Perl's foi fortemente positiva, mas o van Kossa

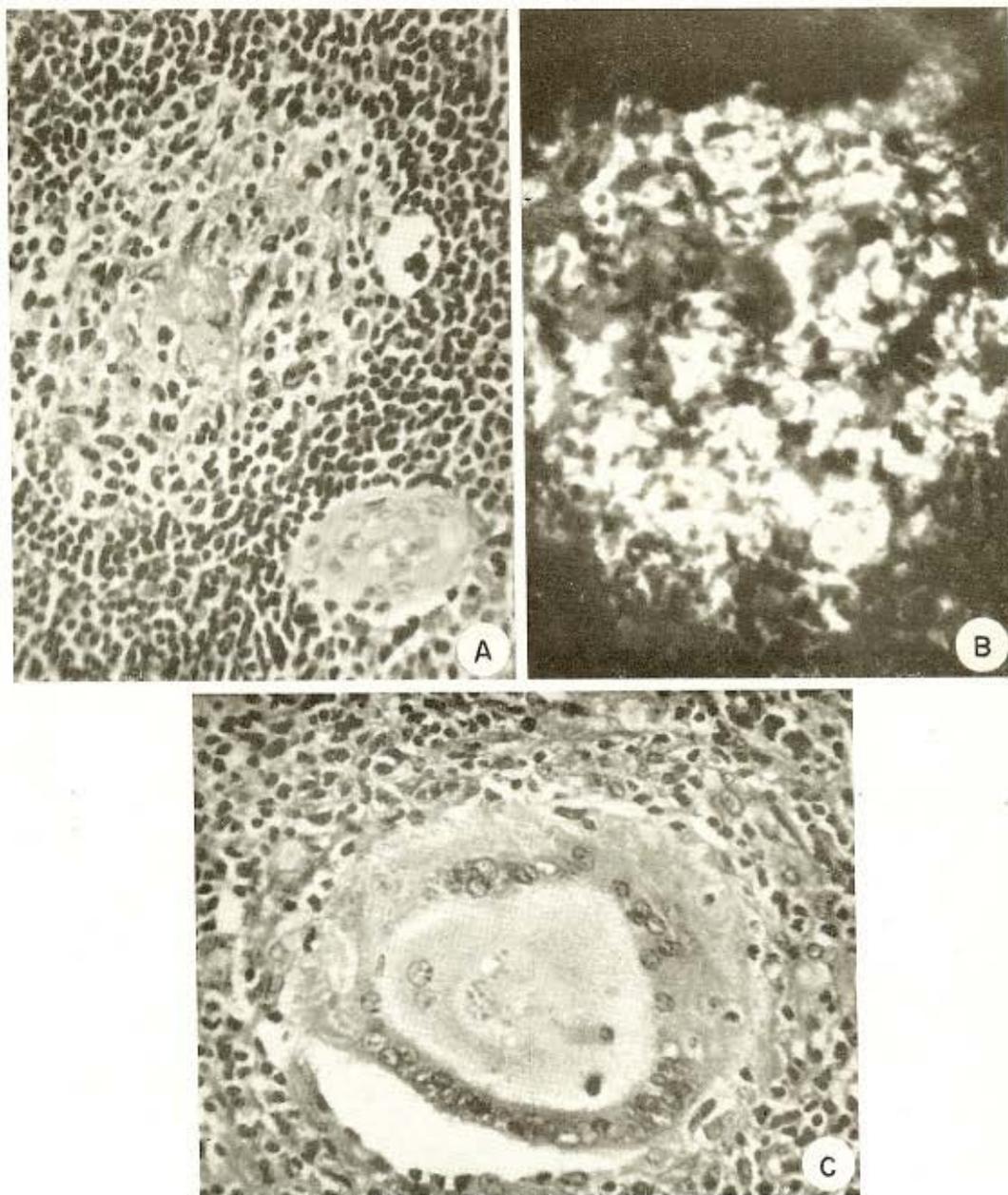


Fig. 5 — A) Presença de material hialino espesso na parte central de um folículo linfóide. É este material que se torna fluorescente para gamaglobulina e aqui aparece no interstício e no interior de células. (H.E. 150×)

B) Material hialino no centro de folículo linfóide mostrando difusa fluorescência específica para gamaglobulina humana. Método de Coons. (200×)

C) Material hialino no centro de um folículo linfóide, sendo englobado por uma célula gigante com numerosos núcleos. (H.E. 200×)

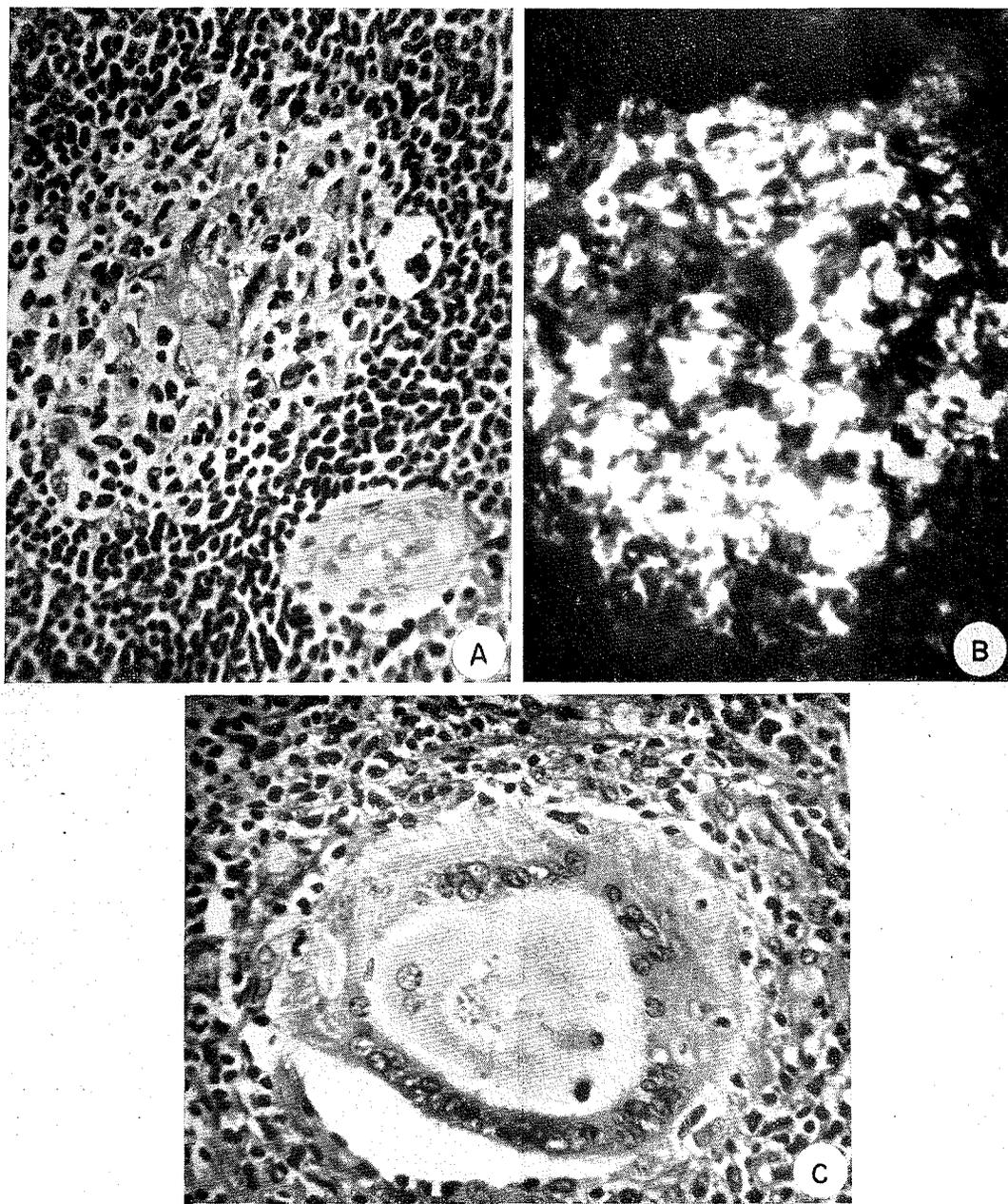


Fig. 5 — A) Presença de material hialino espesso na parte central de um folículo linfóide. É este material que se torna fluorescente para gamaglobulina e aqui aparece no interstício e no interior de células. (H.E. 150×)

B) Material hialino no centro de folículo linfóide mostrando difusa fluorescência específica para gamaglobulina humana. Método de Coons. (200×)

C) Material hialino no centro de um folículo linfóide, sendo englobado por uma célula gigante com numerosos núcleos. (H.E. 200×)

foi negativo. Nos cortes em série, o centro da zona hemorrágica aparecia ocupado por arteríola, que raramente mostrava fibrose das paredes e zonas dilatadas, mas sem solução de continuidade. Em hemorragias mais iniciais foi verificado que a maior densidade do foco hemorrágico correspondia à zona de transição entre a arteríola e os seios venosos.

Os vasos sanguíneos, estudados com o auxílio de injeções de massas coradas, apareciam proeminentes, tendo ficado bem evidente a disposição multilobar da vascularização esplênica. Não foi possível se verificar comunicação artério-venosa nas preparações. A gelatina injetada na veia esplênica facilmente atingia os seios venosos e aparecia também nas artérias das traves e trabéculas. O percurso inverso pôde ser facilmente demonstrado com a injeção intra-arterial. O modelo de vinilite por vezes mostrava finas ramificações terminais que foram identificadas como seios venosos dilatados. Nos cortes em série foi possível se acompanhar o trajeto das arteríolas até sua desembocadura diretamente no interior dos seios venosos dilatados. A gelatina passava da arteríola diretamente para o interior dos seios, muito embora pequena quantidade pudesse ser observada entre as células dos cordões esplênicos.

DISCUSSÃO

Estudando experimentalmente a esplenomegalia congestiva, MENON²⁴ demonstrou que a congestão isoladamente não era capaz de aumentar o peso do baço além de duas vezes o normal. Mc MICHAEL²¹ afirmou que aumento do baço humano além de 500 g não poderia ser explicado apenas pela congestão. Vários Autores^{8, 11, 18, 22, 25} têm sugerido que algo mais, além da congestão, contribui na patogenia da esplenomegalia "congestiva". Este outro fator tem sido definido como "uma reação hépato-lienal", "reações fibróticas e proliferativas", "hiperplasia retículo-endotelial", etc. O fato é que a demonstração morfológica de alterações outras que não as congestivas no tipo de esplenomegalia que ora estudamos, ainda se resente do emprêgo de técnicas insuficientes. Segundo BARKA & col.⁷, o conceito de sistema retículo-endotelial ainda possui bases morfológicas e bioquímicas imprecisas. A

verificação de que as células retículo-endoteliais contêm grande concentração de lisosomas no citoplasma (organelas contendo enzimas hidrolíticas com funções digestivas e de armazenamento), representa progresso no estudo da questão. A demonstração de alta concentração citoplasmática de fosfatase ácida, uma enzima dos lisosomas, representa um método morfológico racional para a caracterização dos elementos celulares do sistema retículo-endotelial. A esterase não específica, embora não sendo uma enzima do lisosoma, existe em grande concentração nas células reticulares e a sua demonstração histoquímica pode também servir para identificação e avaliação funcional das ditas células. A utilização destes métodos histoquímicos no presente trabalho permitiu a comprovação de que na esplenomegalia da esquistossomose as células reticulares são mais numerosas do que o que se pode avaliar após o emprêgo dos métodos histológicos. Muitas células fusiformes, comprimidas na polpa esplênica pela distensão dos seios venosos e facilmente confundíveis com fibroblastos, revelam sua natureza reticular com os métodos histoquímicos. A presença destas células alongadas talvez tenha levado muitos Autores a admitirem a existência de uma fibrose dos cordões esplênicos, que, pelo menos na maioria dos casos, não existe. O grande número de células reticulares nos cordões esplênicos faz contraste com a falta de elementos indicativos de proliferação celular atual. Tudo indica que estas células tiveram uma fase de intensa proliferação, seguida de estado de relativo repouso, antes do aparecimento das alterações congestivas, como pode ser observado experimentalmente^{3, 19}. Outro dado sugestivo da existência de uma fase inicial de predominante proliferação reticular, é que a esplenomegalia esquistossomótica nos indivíduos jovens mostra acentuada hiperplasticidade, em contraste com as alterações predominantemente congestivas nos indivíduos idosos¹⁸. Tal tem sido também observado na esplenomegalia que se associa à cirrose hepática observada na Ásia ("esplenomegalia tropical"⁸).

Já foi demonstrado experimentalmente que a proliferação reticular do baço na esquistossomose é parte de uma resposta à estimulação antigênica e a ela se seguem diferenciação plasmocitária e secreção de gamaglobulina³. Tal reação pode ser mes-

mo observada no baço mantido fora da circulação portal (marsupialização)¹. No baço humano se pode também observar a presença de focos de plasmocitogênese, com células secretando material P.A.S. positivo e gamaglobulina. A relação destes achados com o *S. mansoni* não é tão evidente como no material experimental. O baço aumentado de volume é imunologicamente ativo²⁰ e no homem são múltiplas as possibilidades de estimulações antigênicas. Todavia, como o *S. mansoni* e seus produtos são altamente antigênicos, como já demonstraram estudos histoquímicos⁴, bioquímicos³⁰ e imunocitoquímicos^{5, 17} e os nossos pacientes estavam todos infetados por este trematódeo, é possível que suas estimulações antigênicas tivessem permanecido constantes no curso da doença. Funcionalmente, tais alterações se revelam nas modificações da fração globulina do plasma^{12, 27} e na presença de anticorpos circulantes contra o *S. mansoni*¹⁵.

As alterações observadas ao nível dos centros claros dos folículos linfóides também se revestem de muito interesse. A presença de gamaglobulina a este nível poderia representar simples deposição a partir do plasma sanguíneo ou seria parte de complexo antígeno-anticorpo. A positividade face ao P.A.S. revela também a presença de complexo glicoprotéico além da gamaglobulina. A semelhança morfológica, bioquímica³² e imunológica³³ deste material com as várias formas de amilóide é bem evidente, muito embora não tenha havido metacromasia com o azul de toluidina. Estes achados, que necessitam novas investigações, indicam o profundo comprometimento do sistema retículo-endotelial do baço na esquistossomose hepatoesplênica. Experimentalmente, a infecção esquistossomótica pode acentuar a deposição amilóide, provavelmente pela sua capacidade de estimulação do sistema retículo-endotelial². TEILUM³² observou que as estimulações antigênicas repetidas provocam intensa proliferação reticular, com diferenciação plasmocitária e secreção de material P.A.S. positivo, o qual pode ser depositado como amilóide em certas circunstâncias. Em nossos casos, a presença de material hialino no centro dos folículos linfóides parece facilitar a deposição de feixes colágenos a este nível e por vêzes pode suscitar reação granulomatosa, tipo sarcóide.

Quanto ao estudo sobre a vascularização do baço, não nos foi possível demonstrar a presença de fistulas arteriovenosas nos grossos e médios vasos esplênicos. Sabe-se que a presença de tais fistulas pôde, por si só, produzir hipertensão portal com tôdas as suas conseqüências. Até 1961, 14 casos já haviam sido publicados^{14, 16}, havendo 2 casos brasileiros^{23, 28}, em pacientes não portadores de esquistossomose. Contudo, o problema da transmissão da pressão da artéria esplênica ao sistema venoso portal em nossos casos não fica totalmente afastada. Nossos achados concordam com a verificação de MOSCOWITZ²⁶ de que a circulação na esplenomegalia congestiva é "fechada". Os seios venosos, devido à dilatação e ao espessamento de suas paredes, podem funcionar como vênulas e podem representar, na realidade, múltiplas fistulas arteriovenulares intra-esplênicas. Estes fatos talvez expliquem em parte os efeitos benéficos da esplenectomia como terapêutica cirúrgica da hipertensão portal na esquistossomose.

Quanto ao local de ruptura vascular nos focos hemorrágicos, comumente referidos como nódulos de Gandy-Gamna, os nossos achados confirmam os de MC MICHAEL²¹, segundo os quais a hemorragia se dá na terminação das arteríolas penicilares e que na produção da mesma o elemento fundamental é a hipertensão venosa.

SUMMARY

Pathology of the spleen in hepato-splenomegalic schistosomiasis

A morphological study was made of spleens removed surgically from patients with hepato-splenic schistosomiasis mansoni. Histological, histochemical, and immunocytochemical studies were made, as were injections of the splenic vessels. The following conclusions were made: a) there are many more reticulo-endothelial cells in the red pulp and in the white pulp than are noted using classical methods; b) fusiform cells resembling fibroblast in conventional sections were seen to have the histochemical reactivity of reticulo-endothelial cells; c) proliferation of fibroblast was absent and fibrosis of the splenic cords was seldom seen, in contrast with the findings of previous studies; d)

foci of plasma cells containing intracytoplasmic glycoprotein and synthesizing gamma globulin were frequently encountered. These findings reflect the profound involvement of the reticulo-endothelial elements of the spleen in schistosomal splenomegaly and indicate the importance of the cellular factor in its pathogenesis.

Congestion was present in all cases. It was found that the venous sinuses function as venules, permitting rapid blood flow, and perhaps the transmission of pressure, from the arterial to the venous sector.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G. — Alterações esplênicas na esquistossomose experimental. I — Estudo com o baço marsupializado. *Hospital* (Rio de Janeiro) 66:773-781, 1964.
2. ANDRADE, S. G. — Amiloidose e esquistossomose experimental. (Em publicação).
3. ANDRADE, Z. A. — Aspectos experimentais da esplenomegalia da esquistossomose. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:249-255, 1962.
4. ANDRADE, Z. A. & BARKA, T. — Histochemical observations on experimental schistosomiasis of mouse. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 11:12-16, 1963.
5. ANDRADE, Z. A.; PARONETTO, F. & POPPER, H. — Immunocytochemical studies in schistosomiasis. *Am. J. Path.* 39:589-598, 1961.
6. BARKA, T. — A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *Nature* (London) 187:248-249, 1961.
7. BARKA, T.; SCHAFFNER, F. & POPPER, H. — Acid phosphatase and the reticulo-endothelial system. *Lab. Invest.* 10:590-607, 1961.
8. BASU, A. K. & AIKAT, B. K. — *Tropical splenomegaly*. London, Butterworths, 1963.
9. DAVIDSON, C. S. — *Some contributions of geographic study to understanding the pathogenesis of cirrhosis*. In "Progress in Liver Disease", vol. 1, p. 7. New York, Grune & Stratton, 1961.
10. DAVIES, B. J. — Histochemical demonstration of erythrocyte esterases. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 101:90-93, 1959.
11. DIAS, C. B. — *A síndrome hepatoesplênica na esquistossomose mansônica*. Tese, Belo Horizonte, 1952. p. 449.
12. FIORILLO, A. M. — Estudo electroforético do soro de pacientes portadores de esquistossomose *mansoni* hepatoesplênica. *Hospital* (Rio de Janeiro) 45:647-651, 1954.
13. HADLER, W. A. — *Morfologia e distribuição das células reticulares do baço normal. Estudo efetuado mediante técnica de impregnação argêntica*. Tese, Ribeirão Preto, São Paulo, 1962, p. 68.
14. HELLENS, A. v. — Arteriovenous fistula as the cause of portal hypertension. *Ann. chir. et gynæc. Fenniae* 49:410-415, 1960.
15. KAGAN, I. G. & PELLEGRINO, J. E. — A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. *Bull. World Health Organ.* 25:611-674, 1961.
16. LÉGER, L.; DÉTRIE, P. & FOURRÉ, J. — Les anévrysmes artériovo-veineux spléniques. *J. chir.* 82:151-166, 1961.
17. LICHTENBERG, F. v. — Studies on granuloma formation. III — Antigen sequestration and destruction in the schistosome pseudo-tubercle. *Am. J. Path.* 45:75-93, 1964.
18. MAGALHÃES Filho, A. & COUTINHO-ABATH, E. — Lesões esplênicas iniciais na esquistossomose mansônica humana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 2:251-259, 1960.
19. MAGALHÃES Filho, A. & COUTINHO-ABATH, E. — Splenic reaction in Swiss albino mice to single and multiple infections with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 10:356-364, 1961.
20. Mc FADDZEAN, A. J. S. & TSANG, K. C. — Antibody formation in cryptogenic splenomegaly. I — The response to particulate antigen injected intravenously. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 50:433-437, 1956.
21. Mc MICHAEL, J. — The pathology of hepatolienal fibrosis. *J. Path. & Bact.* 39:481-502, 1934.
22. MEIRA, J. A. — *Esquistossomose mansoni hepatoesplênica*. Tese. São Paulo, 1951, p. 607.
23. MENDONÇA, L. E. — *Fistula artério venosa entre a artéria e a veia esplênica*. *An. paulist. med. e cir.* 68:73-83, 1954.
24. MENON, T. B. — Venous splenomegaly: a study in experimental portal congestion. *J. Path. & Bact.* 46:357-365, 1938.
25. MENON, T. B. — The splenic reaction in experimental cirrhosis and in pre-cirrhotic intoxication. *J. Path. & Bact.* 46:521-534, 1938.

26. MOSCHCOWITZ, E. — The pathogenesis of splenomegaly in hypertension of the portal circulation: "congestive splenomegaly". *Medicine* 27:187-221, 1948.
27. OLIVEIRA, D. N. G.; SOBRAL, M. C. B. & ALBUQUERQUE, R. H. — Estudo eletroforético das proteínas séricas em papel de celulose acetilada e em tampão Tris-Edta-Ba. II — As frações protéicas na esquistossomose mansônica humana (forma hepatoesplênica). *J. brasil. med.* 8:321-323, 1964.
28. OLIVEIRA, L. A. R. & OLIVEIRA, S. A. — Hipertensão portal e fistula artério-venosa dos vasos lienais. *Med. cir. farm.* 300:200-212, 1962.
29. ROUSSELOT, L. M. & THOMPSON, W. P. — Experimental production of congestive splenomegaly. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 40:705-707, 1939.
30. SMITHERS, S. R. & WILLIAMSON, J. — Antigenic polysaccharide material in cercariae and eggs of *Schistosoma mansoni*. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 55:308-309, 1961.
31. TAFT, E. B. — The problem of a standardized technic for the methylgreen pyronin stain. *Stain Technol.* 26:205-212, 1951.
32. TEILUM, G. — Periodic acid Schiff positive reticulo-endothelial cells producing glycoprotein. *Am. J. Path.* 32:945-959, 1956.
33. VASQUEZ, J. & DIXON, F. J. — Studies on the immunohistochemical analysis of amyloid by the fluorescence technique. *J. Exper. Med.* 104:727-736, 1956.

Recebido para publicação em 8/4/1965.