

maria margarida galvão

Orientador: Nelson Figueiredo Mendes

**estudo imunológico de pacientes sub
metidos à irradiação endolinfática**



**tese de doutoramento
apresentada à faculda
de de medicina da uni
versidade de são paulo**

1972

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1973

PROFESSORES TITULARES

Professor Doutor ANTONIO BARROS DE ULIÃO CINTRA
Professor Doutor AYSH MORAD AMAR (Regente)
Professor Doutor BUSSÂMARA NEME
Professor Doutor CARLOS DA SILVA LACAZ
Professor Doutor CHARLES EDWARD CORBETT
Professor Doutor CONSTANTINO MIGNONE
Professor Doutor EDMUNDO VASCONCELOS
Professor Doutor EDUARDO MARCONDES MACHADO
Professor Doutor EURYCLIDES DE JESUS ZERBINI
Professor Doutor FERNANDO DE OLIVEIRA BASTOS
Professor Doutor FLÁVIO PIRES DE CAMARGO
Professor Doutor GUILHERME RODRIGUES DA SILVA
Professor Doutor HORÁCIO MARTINS CANELAS
Professor Doutor JERÔNIMO GERALDO DE CAMPOS FREIRE
Professor Doutor JOÃO ALVES MEIRA
Professor Doutor JOSÉ GALUCCI (Regente)
Professor Doutor LAMARTINE JUNQUEIRA PAIVA (Regente)
Professor Doutor LUIZ VENÈRE DÉCOURT
Professor Doutor PAULO BRAGA DE MAGALHÃES
Professor Doutor SEBASTIÃO DE ALMEIDA PRADO SAMPAIO

PROFESSORES EMÉRITOS

Professor Doutor ADHERBAL PINHEIRO MACHADO TOLOSA
Professor Doutor ALÍPIO CORRÊA NETTO
Professor Doutor ANTÔNIO CARLOS PACHECO E SILVA
Professor Doutor BENEDITO MONTENEGRO
Professor Doutor EURICO DA SILVA BASTOS
Professor Doutor F. E. GODOY MOREIRA
Professor Doutor FLAMÍNIO FÁVERO
Professor Doutor HILÁRIO VEIGA DE CARVALHO
Professor Doutor JAYME ARCOVERDE DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI
Professor Doutor JOÃO DE AGUIAR PUPO
Professor Doutor JOSÉ B. MEDINA
Professor Doutor PEDRO DE A. MARCONDES MACHADO
Professor Doutor RAPHAEL DA NOVA
Professor Doutor RENATO LOCCHI
Professor Doutor SAMUEL B. PESSÓA

NOTA:- A Faculdade não aprova nem reprova as opiniões exaradas nas teses que lhe são apresentadas.

Li' Biblioteca
do I E A,
Mangaride

À memória de meu pai

À minha mãe

Aos meus irmãos

Ao Giló

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Geraldo de Campos Freire, pelo apoio que sempre nos deu.

Ao Doutor Emil Sabbaga, pelos constantes ensinamentos, incentivo, apoio e orientação.

Ao Professor Nelson Figueiredo Mendes pela orientação dêste trabalho.

Ao Doutor José Carlos Barberio pela

concessão e preparação do material radioativo utilizado neste estudo.

Ao Doutor Júlio Kieffer pelas sugestões e orientação e a toda equipe do Serviço de Radioisótopos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo pela colaboração.

Ao Doutor Carlos Victorio Seriancic pela inestimável colaboração na administração do material radioativo.

Ao Doutor Helio Bernardes Silva pelo apoio e colaboração.

Aos Doutores Vicente Cezar Massola, Jamil Murad e Celso Fonseca pelo auxílio prestado.

Ao Doutor Luiz Manoel Costa Santos pela correção ortográfica do texto.

Aos Doutores Dirceu Pfuhl Neves e Otávio Arminio Germek pela orientação na análise estatística.

Às Doutoradas Chloé Musatti, Zulma F. Peixinho, Marina Colnai e Silvia S. Miki da Disciplina de Imunologia da Escola Paulista de Medicina pela colaboração.

Ao Doutor Fernando Teixeira Mendes pela Colaboração.

A todos meus ex-professores e colegas da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará, aos quais devo o início de minha formação médica.

A todos os meus colegas da Unidade de

Transplante e clínica Urológica.

A todos os funcionários da Unidade de
Transplante Renal.

Ao Doutor Gil Anderi da Silva pela cons
tante colaboração, apoio, sugestões e datilografia.

Í N D I C E

I	-	INTRODUÇÃO.....	1
II	-	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	7
		II.1. Dinâmica do Trabalho.....	7
		II.2. Métodos.....	17
		II.3. Aspectos dosimétricos.....	20
III	-	RESULTADOS.....	23
IV	-	DISCUSSÃO.....	37
V	-	CONCLUSÕES.....	43
VI	-	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

I - I N T R O D U Ç Ã O

A linfografia vem sendo utilizada desde 1957 tanto no plano experimental como com finalidade de exploração clínica do sistema linfático. Em 1961 foi realizada pela primeira vez com finalidade terapêutica por Chiappa e colaboradores (16) incorporando I^{131} ao Lipiodol ultrafluido.

Outros autores sucederam-se no emprego do método e a experiência foi se avolumando na literatura, no que diz respeito ao seu uso em doenças sistêmicas do aparelho linfo-reticular, neoplasias epiteliais malignas

de órgãos pélvicos e melanoblastoma de membros inferiores (1, 4, 9, 11, 12, 19, 23, 43).

Em 1965 Siegel (46) publicava sua experiência com Ethiodol radioativo no tratamento do câncer pélvico em 18 pacientes, como terapêutica complementar. No decorrer do mesmo ano Calne e colaboradores (52) mostravam experimentalmente a ação imunossupressora da injeção endolinfática de radionuclídeos em cães transplantados de rim, enquanto Kauffman e colaboradores (25) demonstravam a maior sobrevida de aloenxertos renais em cães após irradição local do enxêrto.

Nos anos subsequentes inúmeros trabalhos relatavam resultados obtidos no tratamento da leucemia linfática crônica (10, 15) e da doença de Hodgkin (16). Paralelamente Cronkite (17) obtinha acentuada e prolongada linfopenia com sessões de 2 a 48 horas de irradiação extracorpórea de sangue ou de linfa do duto torácico e, consequentemente, um aumento do tempo de sobrevida de enxêrto de pele em bezerros. O mesmo método se mostrava de grande valia para o tratamento da leucemia linfática crônica e leucemia granulocítica crônica, parecendo todavia ser de valor limitado nas remissões desta última entidade. Consta-tou-se então, que um fator limitante no uso da irradiação extracorpórea de sangue, no homem, é o acúmulo progressivo de dose hemolizante de irradiação pelas hemácias.

Joel e colaboradores (24) obtiveram redução do número de células imunologicamente competentes e retardo e supressão da resposta citotóxica anticórpica em bezerros submetidos à irradiação extracorpórea de linfa do

duto torácico.

Trabalhos recentes vieram ressaltar a linfopenia seletiva e o aumento do tempo de sobrevivência de enxerto de pele, determinados em animais de laboratório pela injeção endolinfática de radioisótopos (49).

Paralelamente, relatos de experiência clínica em câncer de reto (20) e carcinoma mamário de pacientes que receberam irradiação paraesternal pós-operatória (48) põem em dúvida seu efeito terapêutico para os referidos casos e, realçam a sua ação linfopênica.

Wheeler e colaboradores (52) publicaram sua experiência com Au^{198} mostrando que dose igual ou superior a 37 mCi seria capaz de duplicar o tempo de sobrevivência do aloenxerto renal no grupo tratado com relação ao grupo controle.

Outros autores considerando a grande destruição do nódulo linfático e a acentuada linfopenia consequente à irradiação com I^{131} sugeriram que esta técnica poderia ser de valia no preparo do hospedeiro para aceitar um aloenxerto (51).

Confirmação de tais achados foram feitas por Chiba e colaboradores (13) que assinalaram paralela diminuição da formação de anticorpos contra proteína estranha em animais linfopênicos.

Em 1968 Szabó (49) irradiando linfonodos regionais com injeção endolinfática de substância radioativa confirmava a eficiência do método para prolongar a

sobrevida de aloenxerto em animais.

Entre todos os radioisótopos utilizados o Lipiodol marcado pareceu satisfazer melhor certos requisitos básicos tais como localização seletiva, adequada radioatividade e ausência de risco e de efeitos colaterais importantes para o paciente. O contraste oleoso permanece no nódulo linfático. O iodo estável do Lipiodol sendo substituído pelo isótopo (I^{131}) através de trocas iônicas, é uniformemente distribuído, permanecendo longo tempo no nódulo. Como é um emissor primariamente, β , seu efeito de irradiação é praticamente confinado ao sistema linfático, sem comprometimento das substâncias vitais adjacentes. Sua emissão γ permite o registro cintilográfico e possibilita portanto, verificar a distribuição do I^{131} no corpo. Finalmente, seu produto de degradação não é tóxico (16, 31, 42, 46), não parece afetar diretamente a medula óssea (10) e a irradiação hemática é inferior àquela que ocorre nos casos de tratamento de câncer de tireóide e de hipertireoidismo (7).

Em 1967 a Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo começou a empregar a injeção endolinfática de Lipiodol I^{131} na fase de pré-transplante, como medida imunossupressora. Em um período de 4 anos a partir de então 17 pacientes foram submetidos a tal medida terapêutica, sendo: 3 em 1967, 5 em 1968, 5 em 1969 e 4 em 1970 (27, 33). Até então a substância em questão não havia sido usada como medida imunossupressora em transplante humano.

Shigata em 1968 (45) encorajado pelos resultados obtidos em cães, utilizou injeção endolinfática de

ouro radioativo em 6 casos clínicos de transplante de rim obtendo linfopenia acentuada e persistente. A administração de Au^{198} em combinação com azatioprina influenciou a linfopenia em intensidade e duração provando ser um método que possibilitaria a redução das doses habituais de azatioprina e prednisolona prevenindo o desenvolvimento de complicações pós operatórias.

Recentemente foram descritos marcadores de membrana que permitem a distinção entre linfócitos humanos T (timo-dependentes, responsáveis pelas reações de hipersensibilidade tardia) e B (timo - independentes responsáveis pelas respostas humorais) (29, 47). Os linfócitos T possuem receptores de membrana para hemácias de carneiro (E) que os torna capazes de formar rosáceas ao passo que os linfócitos B, através de um receptor para C_3 , unem-se a hemácias tratadas por anticorpo e complemento (EAC) formando rosáceas (3, 18). Este método também permite a detecção de linfócitos humanos T e B em secções de tecido linfóide através da aderência de EAC ou de E (47).

O presente trabalho tem como objetivo estudar imunologicamente pacientes submetidos à irradiação endolinfática com I^{131} visando os seguintes itens, comparativamente nos períodos pré e pós irradiação:

- 1 - contagem dos linfócitos periféricos;
- 2 - proporção de linfócitos T e B, periféricos;
- 3 - estrutura dos nódulos linfáticos;
- 4 - presença de linfócitos T e B nos nódulos linfáticos;
- 5 - resposta "in-vitro" dos linfócitos periféricos à fitohemaglutinina;

6 - resposta a testes cutâneos de leitura tardia com antígenos de microrganismos e sensibilização primária ao dinitroclorobenzeno.

II - CASUÍSTICA E MÉTODOS

II.1. - Dinâmica do trabalho

Do grupo de pacientes aguardando transplante na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, foram escolhidos ao acaso, independentemente de sexo, grupo etáreo e etiologia da doença primária, 9 pacientes entre 13 e 45 anos, sendo 4 do sexo masculino (EMC, MR, SC e NER) e 5 do sexo feminino (SN, EOL, MDC, SMA e HRO) (tabela 1).

Foi utilizada uma solução ultrafluida

de Lipiodol contendo I^{131} preparado por técnica de substituição (fornecido pelo laboratório de rádio-fármácia do Instituto de Energia Atômica), com atividade específica variando entre 2,5 e 4,7 mCi/ml. Um volume fixo de 5ml para cada membro inferior foi injetado via linfático do dorso do pé. Desta forma doses totais de 25 a 45 mCi foram empregadas. Fazem exceção 3 pacientes (EOL, MR e NER) que por dificuldades técnicas receberam a dose integral através de um único membro.

Objetivando minimizar o efeito sobre a glândula tireóide, do I^{131} liberado pela progressiva metabolização dos ésteres que compõem o Lipiodol, o "pool" de iodeto sistêmico foi mantido permanentemente expandido mediante a administração de repetidas doses de compostos iodados (solução de lugol, iodeto de sódio).

O nível atingido pelo Lipiodol no sistema linfático foi controlado radiologicamente, evidenciando as estações de linfonódios atingidas. O extravasamento para o sistema venoso foi controlado por cintilografia pulmonar.

Em todos os pacientes realizou-se durante um mês pós irradiação a determinação dos seguintes parâmetros:

- 1 - Contagem de linfócitos periféricos - determinação prévia dos valores basais em 3 colheitas sucessivas e 2 de terminações por semana durante todo o período de estudo (tabela 2). Adotou-se como valor de referência antes do tratamento a média aritmética dos valores encontrados em exames feitos em três dias diferentes: Os resul-

T A B E L A 1

Dados clínicos gerais

Nome nº *	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico
EMC 158	15	m	GNC + HM
EOL 156	24	f	GNC
MR 118	45	m	GNC
MDC 160	22	f	GNC
SC 163	45	m	RP
SN 169	15	f	GNC
NER 172	16	m	GNC + PNC
SMA 173	13	f	RCS
HRO	30	f	HR

GNC = glomerulonefrite crônica

HM = hipertensão maligna

RP = rim policístico

PNC = pielonefrite crônica

RCS = rim contraído secundário

HR = hipoplasia renal

* número de ordem do transplante na UTR

tados das contagens efetuadas nos vários dias que se seguiram à injeção endolinfática foram expressos em porcentagem, em relação ao nível de referência com o fito de homogeneizar os resultados, eliminando a diferença inicialmente existente entre indivíduos. Procedeu-se ao ajuste das equações linear, quadrática e cúbica pelo método dos mínimos quadrados; calculou-se também o coeficiente de correlação.

- 2 - determinação da prevalência relativa de linfócitos tipo T e B no sangue periférico nas mesmas amostras citadas no item anterior. Os valores obtidos antes e após a irradiação foram submetidos ao mesmo tratamento matemático dos linfócitos periféricos (tabelas 3 e 4) e, além disso, foram comparados nas suas médias pelo teste t de Student.
- 3 - estudo do nódulo linfático mediante biópsia realizada para obtenção de linfonódio inguinal pré-irradiação e 30 dias após. Neste material foi feito estudo anátomo-patológico e analisada a distribuição de linfócitos T e B através do padrão de aderência para eritrócitos de carneiro (E) e complexos hemácia-anticorpo-complemento (EAC);
- 4 - apreciação da variação do tamanho de nódulo linfático irradiado através de estudo radiográfico no dia da irradiação e um mês após; feita em 4 pacientes;
- 5 - medida da resposta do linfócito periférico à fitohemaglutinina em 2 amostras no período pré-irradiação e em amostras semanalmente colhidas pós-irradiação;
- 6 - verificação da hipersensibilidade tardia "in vivo" pré e pós irradiação, através da resposta cutânea a diferentes

TABELA 2

Linfócitos periféricos: contagem global e percentual

Pacientes		contro le	P Ó S - I R R A D I A Ç Ã O									
EMC	Dias	0	1	4	5	13	15	18	20	22	26	29
	C. G.	1165	712	608	528	374	420	232	342	540	490	420
	C. P.	100	61,1	52,1	45,3	32,1	36,0	19,9	29,3	46,3	42,0	36,0
EOL	Dias	0	5	7	9	12	16	20	23	27	30	
	C. G.	811	1242	868	1600	780	660	321	208	637	480	
	C. P.	100	153,0	107,0	197,2	96,0	81,3	39,5	25,6	78,5	59,1	
MR	Dias	0	1	4	6	8	12	15	19	22		
	C. G.	1190	992	1040	1071	1035	265	1003	600	735		
	C. P.	100	83,3	87,3	90,0	86,9	22,2	84,2	50,4	61,7		
MDC	Dias	0%	4	7	11	19	21	24	28	31		
	C. G.	2045	988	158	249	652	748	671	795	230		
	C. P.	100	48,3	7,7	12,1	31,8	36,5	32,8	38,8	11,2		
SC	Dias	0	3	5	10	14	18	21	25	28	31	
	C. G.	1516	1180	530	1350	1540	1178	680	941	680	918	
	C. P.	100	77,8	34,9	89,0	101,5	77,7	44,8	62,0	44,8	60,5	
SN	Dias	0	4	7	11	14	18	21	28			
	C. G.	1275	629	572	81	400	180	538	315			
	C. P.	100	49,3	44,8	6,3	31,3	14,1	42,1	24,7			
NER	Dias	0	5	8	12	15	19	22	26	34		
	C. G.	1593	768	693	986	946	873	680	798	912		
	C. P.	100	48,2	43,5	61,8	59,3	54,8	42,6	50,0	57,2		
SMA	Dias	0	4	11	14	17	25	28	32	34		
	C. G.	3819	2100	1120	1183	1040	1190	2120	1320	1425		
	C. P.	100	54,9	29,3	30,9	27,2	31,1	55,5	34,5	37,3		
HRO	Dias	0	4	11	14	18	25	28	32			
	C. G.	1921	912	559	742	1020	459	417	1118			
	C. P.	100	47,4	29,0	38,6	53,0	23,8	21,7	58,1			

C. G. - contagem global

C. P. - contagem percentual

TABELA 3

Linfócitos tipo T: contagem global e percentual

Pacientes		contro le	P Ó S - I R R A D I A Ç Ã O									
EMC	Dias	0	1	4	5	13	15	18	20	22	26	29
	C. G.	384	142	182	111	75	50	60	68	86	122	76
	C. P.	100	36,9	47,3	28,9	19,5	13,0	15,6	17,7	22,3	31,7	19,7
EOL	Dias	0	5	7	9	12	16	20	23	27	30	
	C. G.	259	410	139	400	281	139	58	38	191	158	
	C. P.	100	158,3	53,6	154,4	108,4	53,6	22,3	14,6	73,7	61,0	
MR	Dias	0	1	4	6	8	12	15	19	22		
	C. G.	345	318	291	160	217	58	208	222	308		
	C. P.	100	92,1	84,3	46,3	62,8	16,8	60,2	64,3	89,0		
MDC	Dias	0	4	7	11	19	21	24	28	31		
	C. G.	801	326	24	102	72	351	141	279	64		
	C. P.	100	40,6	2,9	12,7	8,9	43,8	17,6	34,8	7,9		
SC	Dias	0	3	5	10	14	18	21	25	28	31	
	C. G.	458	166	11	243	447	353	177	435	163	192	
	C. P.	100	36,2	2,4	53,0	97,5	77,0	38,6	94,9	35,5	41,9	
SN	Dias	0	4	7	11	14	18	21	28			
	C. G.	325	214	155	22	100	41	102	110			
	C. P.	100	65,0	47,0	6,7	30,7	12,6	31,3	33,8			
NER	Dias	0	5	8	12	15	19	22	26	34		
	C. G.	575	261	229	325	311	367	279	326	337		
	C. P.	100	45,0	39,8	56,5	54,0	63,8	48,5	56,6	58,6		
SMA	Dias	0	4	11	14	17	25	28	32	34		
	C. G.	1429	778	415	284	156	179	720	593	485		
	C. P.	100	54,4	29,0	19,8	10,9	12,5	50,3	41,4	33,9		
HRO	Dias	0	4	11	14	18	25	28	32			
	C. G.	718	310	140	201	296	101	142	380			
	C. P.	100	43,0	19,0	27,0	41,2	14,0	19,7	52,0			

C. G. - contagem global

C. P. - contagem percentual

TABELA 4

Linfócitos tipo B: contagem global e percentual

Pacientes		contro le	P Ó S - I R R A D I A Ç Ã O									
EMC	Dias	0	1	4	5	13	15	18	20	22	26	29
	C. G.	340	107	91	137	64	122	56	68	119	147	84
	C. P.	100	31,4	26,7	40,2	18,8	35,8	16,4	20,0	35,0	43,2	24,7
EOL	Dias	0	5	7	9	12	16	20	23	27	30	
	C. G.	194	186	243	320	328	152	83	67	159	115	
	C. P.	100	95,8	125,2	164,9	169,0	78,3	42,7	34,5	81,9	59,2	
MR	Dias	0	1	4	6	8	12	15	19	22		
	C. G.	249	169	406	171	248	71	247	174	191		
	C. P.	100	67,8	163,0	68,6	99,5	28,5	99,1	69,8	76,7		
MDC	Dias	0	4	7	11	19	21	24	28	31		
	C. G.	582	336	62	87	104	313	121	143	37		
	C. P.	100	57,7	10,6	14,9	17,8	53,7	20,7	24,5	63,5		
SC	Dias	0	3	5	10	14	18	21	25	28	31	
	C. G.	374	236	175	94	200	130	82	94	95	175	
	C. P.	100	63,1	46,7	25,1	53,4	34,7	21,9	25,1	25,4	46,7	
SN	Dias	0	4	7	11	14	18	21	28			
	C. G.	132	170	143	23	84	76	226	101			
	C. P.	100	128,7	108,3	17,4	63,6	57,5	171,2	76,5			
NER	Dias	0	5	8	12	15	22	26	34			
	C. G.	361	223	187	296	340	218	168	201			
	C. P.	100	61,7	51,8	81,9	94,1	60,3	46,5	55,6			
SMA	Dias	0	4	11	14	17	25	28	32	34		
	C. G.	947	315	202	225	198	203	424	172	357		
	C. P.	100	33,2	21,3	23,7	20,9	21,5	44,7	18,1	37,6		
HRO	Dias	0	4	11	14	18	25	28	32			
	C. G.	496	210	123	141	275	101	108	235			
	C. P.	100	42,3	24,7	28,4	55,4	20,3	21,7	47,3			

C. G. - contagem global

C. P. - contagem percentual

tipos de antígenos: tuberculina, PPD, levedurina, histoplasma, esporotriquina, E. coli e a capacidade de sensibilização primária ao dinitroclorobenzeno de acordo com método já padronizado (35). Analisou-se a frequência de negatização dos mesmos no período pós irradiação.

7 - registro cuidadoso, no período imediato à irradiação, de sinais e sintomas eventualmente relacionáveis com o procedimento técnico em estudo.

II.2. Métodos

II.2.1. - Injeção endolinfática do material radioativo

Após visualização do trajeto linfático dos pés mediante injeção intradérmica de corante(alfazurine a 11%) um vaso linfático foi isolado por dissecação e puncionado com agulha montada em catéter especial de polietileno. Após testada sua permeabilidade com solução salina isotônica, foi iniciada a injeção do material radioativo.

Foram acopladas seringas de 20 ml a bombas injetoras, com pressão regulada para manter um fluxo constante de 0,1 ml/min.

II.2.2. - Contagem dos linfócitos periféricos

A contagem dos linfócitos periféricos foi realizada nas amostras referidas, por técnica convencional.

II.2.3. - Técnica para demonstração dos receptores

para E e EAC em suspensões de linfócitos
(29, 30)

Para detectar o receptor para E, volumes iguais (0,1 ml) de suspensão de células linfóides do sangue periférico e de suspensão de eritrócitos de carneiro a 0,5% foram misturados à temperatura ambiente, centrifugados a 200 g por 5 minutos e incubados a 0°C durante 1 hora. As células foram então resuspensas no mesmo sobrenadante e calculou-se a percentagem das rosáceas por contagem de quatro quadrantes em um hemocitômetro contendo aproximadamente 100 células em cada quadrante.

A estrutura da célula envolvida na formação da rosácea foi estudada em esfregaços corados pelo Leishman.

Para demonstrar o receptor para EAC, foram misturados volumes iguais (0,1 ml) de suspensão de células linfóides e de suspensão de EAC (eritrócito de carneiro E, anticorpo-A e complemento de camondongo-C) a 0,5%, centrifugados a 200 g por 5 minutos e incubados a ... 37°C durante 30 minutos. As células foram então resuspensas e a percentagem calculada nas mesmas condições já referidas para receptores de E. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

II.2.4. - Técnica para detecção dos receptores para E
e EAC nos nódulos linfáticos (47)

Foram cortadas secções de 6 μ de espessura em um International Hartis Cryostat e colhidas em

lâminas de microscopia. As lâminas foram secadas à temperatura ambiente, lavadas em tampão fosfato pH 7,4 (PBS) gelado e recobertas com 1 ml de suspensão a 1% de E ou EAC.

Para demonstrar o receptor para Eas preparações foram incubadas 1 hora a 37°C e a seguir 1 hora a 0°C. Para o receptor para EAC as lâminas foram incubadas a 37°C ou à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Após incubação, ambas foram lavadas em PBS, coradas pelo Leishman e examinadas ao microscópio.

II.2.5. - Avaliação do tamanho do linfonódio

As radiografias de abdome foram feitas em condições de absoluta reprodutibilidade com foco ao nível de L₂. O nódulo linfático assim focalizado teve seu volume determinado segundo fórmula empírica sugerida por Tiklak e colaboradores (51), pela qual:

$$\text{volume} = 0,26 y^2 (3x - y)$$

onde x e y correspondem respectivamente aos diâmetros longitudinal e transversal do mesmo.

II.2.6. - Cultura de linfócitos periféricos (2, 37, 38)

Os linfócitos obtidos por sedimentação diferencial do sangue periférico colhido com heparina são colocados em meio de cultura (Eagle modificado para cultura em suspensão, da Grand Island Biological Co. USA) com uma concentração de $0,3 \times 10^6$ linfócitos por ml de meio, contendo 20%

de plasma homólogo de indivíduo normal.

Foram preparadas triplicatas dos tubos de controle e dos tubos com PHA "P" (da Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) a 1:100, contendo cada tubo 2,5 ml como volume final.

Os tubos bem vedados, foram incubados por 72 horas a 37°C. Após esse período, a cada um deles foi adicionado 2 µc de timidina tritiada (Schwarz Bio Research New York, USA, atividade específica 19 c/ml) 5 horas antes do término da cultura.

Após o período de incubação o sobrenadante foi desprezado e o botão celular lavado 2 vezes com ácido tricloroacético a 5%, gelado. O precipitado final foi então dissolvido com 5 gotas de solueno (Packard Instruments, USA), misturado a 10 ml de líquido de cintilação (5 g de PPO/litro de tolueno) e levado a um contador de cintilações (Beckman), para avaliação da timidina incorporada. O período de contagem foi ajustado para 10 minutos. Os resultados foram expressos em índices de estimulação, isto é, quociente entre as duas contagens: dos tubos com PHA e as dos tubos controle, sem PHA. As experiências foram realizadas em duplicata e utilizadas as médias dos valores obtidos.

II.3. - Aspectos dosimétricos

Com o intuito de vincular os efeitos sobre a resposta imunitária, apreciada à luz dos parâmetros descritos tentou-se uma aproximação ao aspecto dosimétrico das doses de energia liberadas ao nível das massas de linfo-

nódios.

Para esta abordagem limitada, insistimos, a uma simples aproximação do problema, nos eram necessários 2 dados de observação: a meia vida efetiva do iodo radioativo nos linfonódios e número e massas individuais dos mesmos. Era ainda necessário aceitar-se distribuição homogênea da dose no nódulo linfático e entre os nódulos. Para aquilatar a meia vida efetiva valemo-nos de medidas de corpo inteiro, aceitando, dado o "bloqueio" tireoidiano, que o ritmo de desaparecimento corpóreo é representativo da meia vida efetiva no linfonódio. Não tendo nem um elemento para efetivamente estimar o número e a massa dos nódulos linfáticos, atingidos, aceitamos ser ela correspondente a 1/3 da massa total de linfonódios do organismo (700 g). Igualmente, aceitamos estar a dose total injetada (25 a 47 mCi) uniformemente distribuída na massa assim estimada. Aplicando-se as fórmulas desenvolvidas para cálculo de doses β e γ liberadas ao nível de órgão e de corpo inteiro (40), poude-se estimar a dose liberada nos linfonódios e a dose γ de corpo inteiro.

Determinação da meia vida efetiva do radio-iodo

Com o contador de corpo inteiro para uso clínico IEA-II (26), empregado como detector estacionário e, a geometria reprodutível, a uma distância de 1,30 m (em virtude da dose elevada), realizaram-se medidas distribuídas no tempo, dos pacientes prontos e supinos. Os valores líquidos da soma das contribuições nas 2 posições foram lançados em gráficos semi-logarítmicos. A reta que melhor satisfizesse os pontos experimentais foi traçada e extrapolada à ordenada de t_0 . O semi período efetivo foi avaliado gráfica-

mente.

Cálculos dosimétricos

Utilizaram-se as fórmulas e as aproximações sugeridas por Quimby (40). Assim para dose β usou-se a expressão:

$$D_{\beta} = 73,8 C \bar{E}_{\beta} T_{ef}$$

com os seguintes dados numéricos:

$$T_{ef} = 7,6$$

$$\bar{E}_{\beta} = 0,187 \text{ MeV}$$

Em t_0 a dose foi 90% da dose administrada;

$$\text{dose } \gamma = 0,0346 \sqrt{CT\bar{g}}$$

onde: $C = (\mu\text{Ci/g})$;

$\sqrt{\quad}$ = ritmo da dose integrada;

\bar{g} = fator de geometria e

T = meia vida em dias

III - R E S U L T A D O S

1 e 2 - Contagem de linfócitos periféricos e determinação de prevalência relativa de linfócitos tipo T e B.

Os coeficientes de correlação entre o número de dias após a injeção e as contagens de linfócitos periféricos, T e B foram respectivamente:

- 0,292

- 0,177

- 0,223

sendo significativo ao nível de 5% apenas para o primeiro.

O exame da variância residual observada com as equações quadrática e cúbica mostrou que estas curvas não traduzem o fenômeno de maneira melhor que a simples regressão linear. Ademais, coincidindo com a correlação significativa obtida entre os números de dias após a injeção radioativa e as contagens de linfócitos periféricos, a análise de variância da regressão linear mostrou, nesta eventualidade, que se podia aceitar a hipótese de nulidade dos parâmetros angular e linear da equação de regressão ($F = 6,728$ e $219,075$ respectivamente para 1 e 72 graus de liberdade). Tal não se dá com as regressões lineares estabelecidas com linfócitos tipos T e B ($F = 3,661$ e $148,420$ para B com 1 e 70 graus de liberdade; $F = 2,328$ e $152,420$ para T com 1 e 72 graus de liberdade) em que a hipótese de nulidade só foi rejeitada em relação aos parâmetros lineares.

Pela inspeção das curvas (figura 1) obtidas com as equações de 2º grau tem-se a impressão de que aproximando-se do fim do período de observação há uma tendência para uma subida dos valores das contagens, o que entretanto não é de magnitude suficiente para se poder fazer uma afirmativa mais segura. Acreditamos que se nossa observação tivesse se estendido por mais 2 semanas este fenômeno se tornaria mais nítido. Na tabela 5 encontram-se os valores da média dos linfócitos T e B, antes e após o tratamento pela irradiação endo-linfática, observando-se diminuição da média, estatisticamente significativa.

Tabela 4
Valores médios dos linfócitos T e B

	T	B
Antes	644,133	458,286
Após	222,608	171,973
Valor <u>t</u>	3,199	3,324

3 - Estudo do nódulo linfático

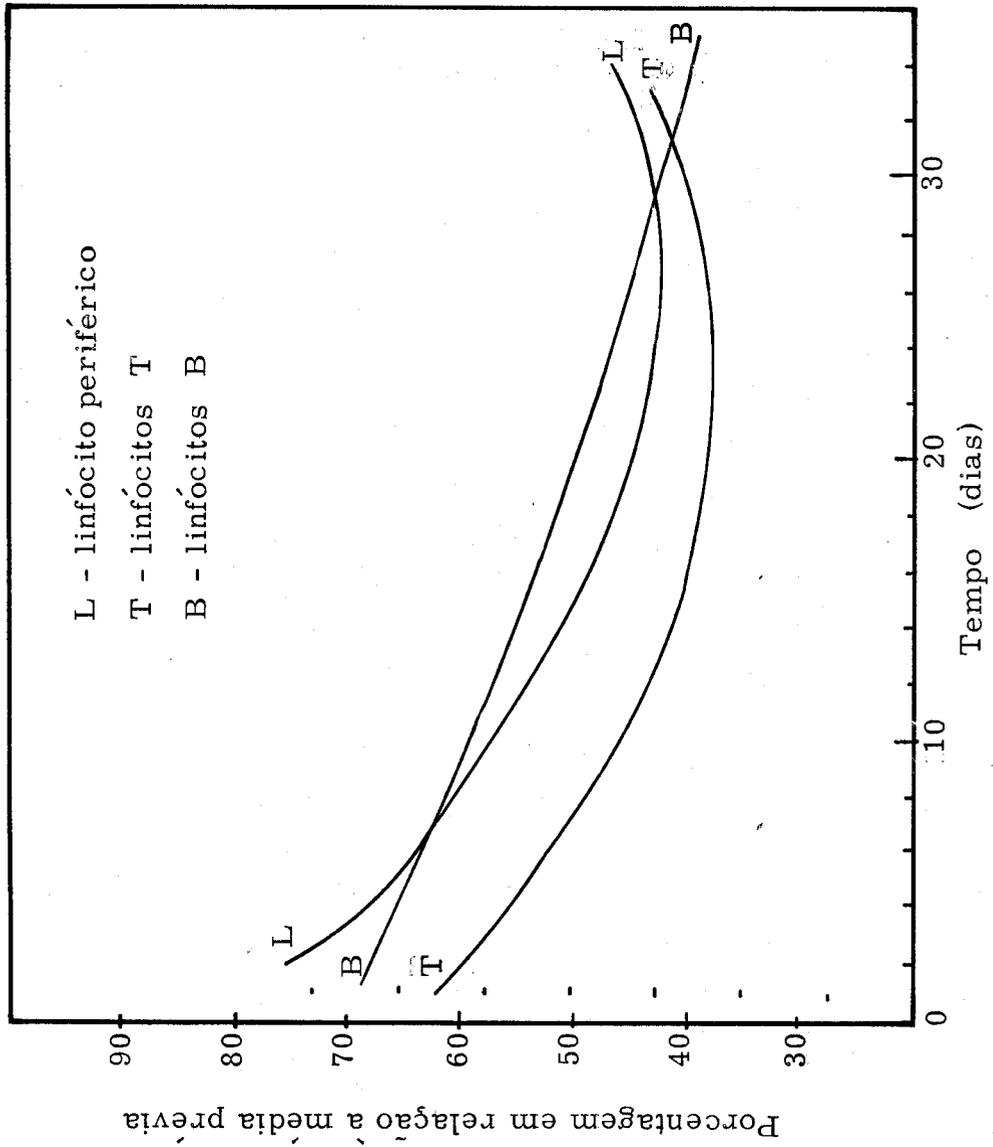
O aspecto anatomo-patológico foi uniforme em todos os casos: o linfonódio pré-irradiado (sempre retirado da região inguinal) mostrou sua estrutura preservada, cápsula íntegra, folículos linfóides grandes com pequena reatividade central, medular com seios dilatados preenchidos de células histiocitárias alongadas caracterizando a reticulo-se própria do nódulo linfático inguinal (figuras 2 e 3).

Após a irradiação, todos os linfonódios apresentaram sua estrutura geral totalmente alterada pela diminuição e quase desaparecimento dos folículos linfóides situados geralmente na periferia, os quais eram pequenos e não reativos; houve, outrossim, desaparecimento praticamente total dos seios da medular; encontrou-se ainda uma substituição do parênquima por tecido conjuntivo denso, vasos de paredes espessadas e luz irregular, além da presença de células gigantes do tipo corpo estranho em torno de cistos vazios que correspondem provavelmente a linfáticos dilatados (figuras 4 e 5).

Nos linfonódios não irradiados, houve em todos os casos boa adesão esparsa para E em todo a nódulo, tanto a fresco como após coloração pelo Leishman (figura 6). Para EAC predominou a adesão em padrão folicular com vários folículos preenchidos (figura 8).

Após a irradiação, os nódulos linfáticos apresentaram desintegração dos folículos, não apresentando adesão para E ou EAC (figuras 7 e 9) quer a fresco ou após coloração, evidenciando a depleção local de linfócitos T e B.

Figura 1 - Regressão quadrática para os linfócitos periféricos, tipo T e tipo B



4 - Apreciação da variação do tamanho do linfonólio irradiado

Observou-se uma redução de volume do nódulo linfático sempre superior a 50% (51,8; 73,6; 85,0 e 87,4%) no fim do primeiro mes após irradiação (figuras 10 e 11).

5 - Medida da resposta do linfócito periférico à PHA

Após a irradiação, os linfócitos periféricos não perdem sua capacidade de resposta "in vitro" a este agente mitogênico. Apenas dois pacientes (EMC e SN) apresentaram níveis de resposta pós irradiação aparentemente inferiores aos níveis prévios. Entretanto o número de determinações não foi suficiente para uma análise estatística (tabela 6).

6 - Verificação de hipersensibilidade tardia "in vivo".

A maioria dos pacientes no período pré irradiação apresentou provas de hipersensibilidade tardia negativas, o que constitui característica do estado urêmico (14, 28, 53 e 54). Dois (SC e HRO) foram positivos para tricofitina, dois (EOL e MR), para levedurina e dois (SN e HRO), para dinitroclorobenzeno. Todos apresentaram negativação destas respostas cutâneas após a irradiação, exceto a paciente HRO que manteve positividade de 3 cruzeiros para o dinitroclorobenzeno.

7 - Efeitos Colaterais -

Não foram constatados efeitos colaterais de importância para os pacientes relacionados com a in-



Figura 2 - Aspecto aná-
tomo-patológico de lin-
fonódio inguinal, pré-ir-
radiação. Paciente SN.
Aumento de 100 vezes.

Figura 3 - Aspecto aná-
tomo-patológico de lin-
fonódio inguinal, pré-ir-
radiação. Paciente NER.
Aumento de 100 vezes.



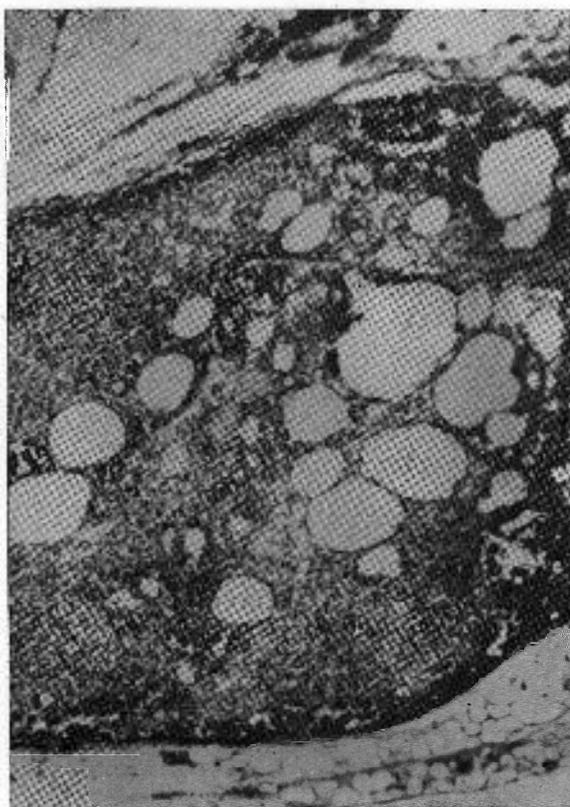


Figura 4 - Aspecto aná-
tomo-patológico de lin-
fonódio inguinal, pós-ir-
radiação. Paciente SN.
Aumento de 100 vezes.

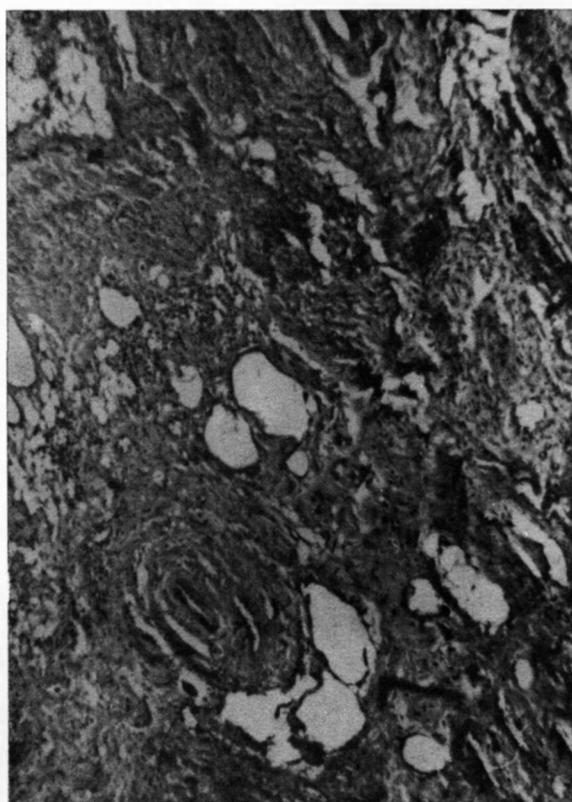


Figura 5 - Aspecto aná-
tomo-patológico de lin-
fonódio inguinal, pós-ir-
radiação. Paciente NER.
Aumento de 100 vezes .

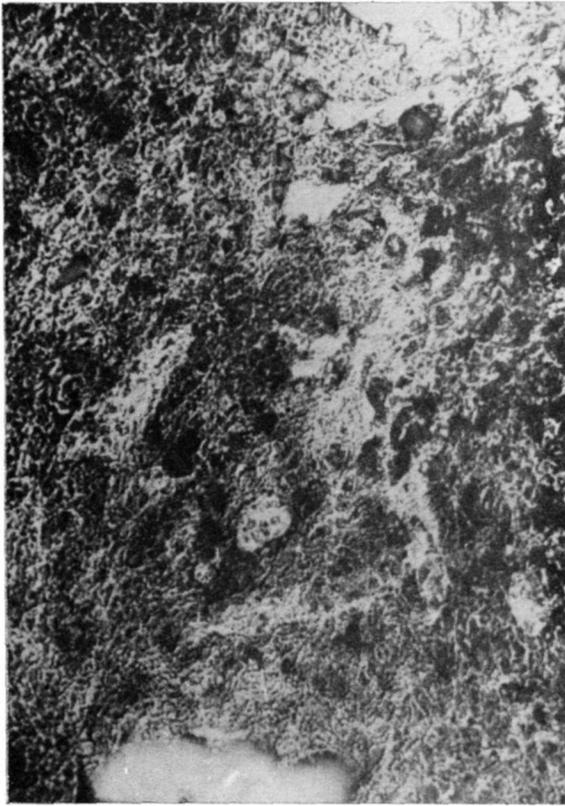


Figura 6 - Padrão de aderência para E, em linfonólio inguinal do paciente SMA, pré-irradiação. Aumento de 330 vezes.

Figura 7 - Padrão de aderência para E, em linfonólio inguinal do mesmo paciente da figura 5, pós-irradiação. Aumento de 100 vezes.

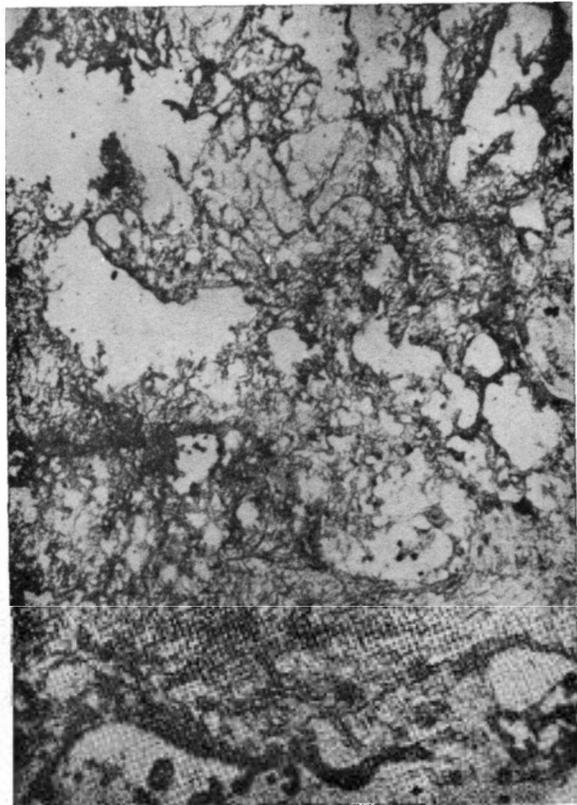
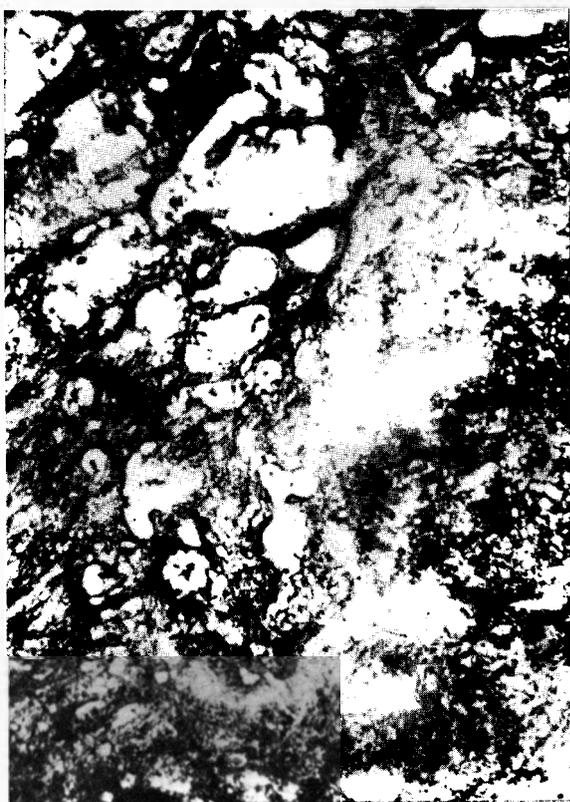




Figura 8 - Padrão de aderência para EAC, em linfonóidio inguinal do paciente NER, pré-irradiação. Aumento de 660 vezes.

Figura 9 - Padrão de aderência para EAC, em linfonóidio inguinal do mesmo paciente da figura 5, pós-irradiação. Aumento de 100 vezes.



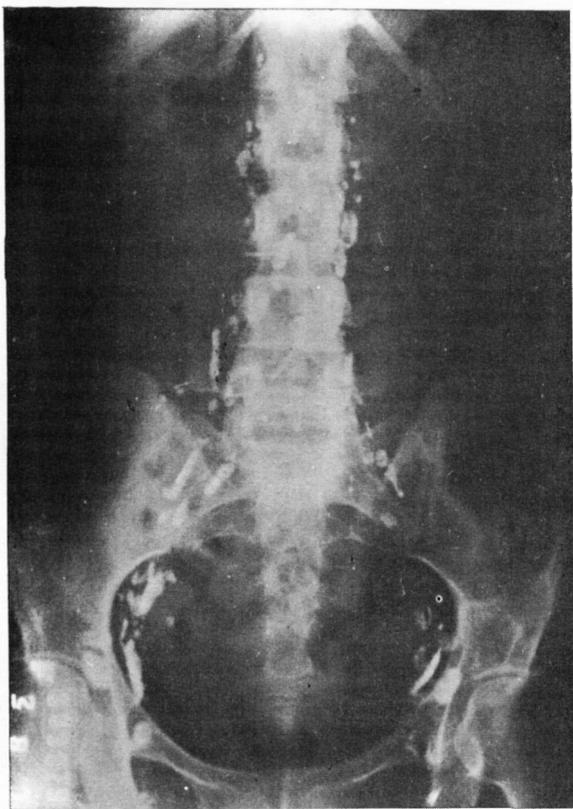


Figura 10 - Radiografia simples de abdome, da paciente HRO, 24 horas após irradiação endolinfática.

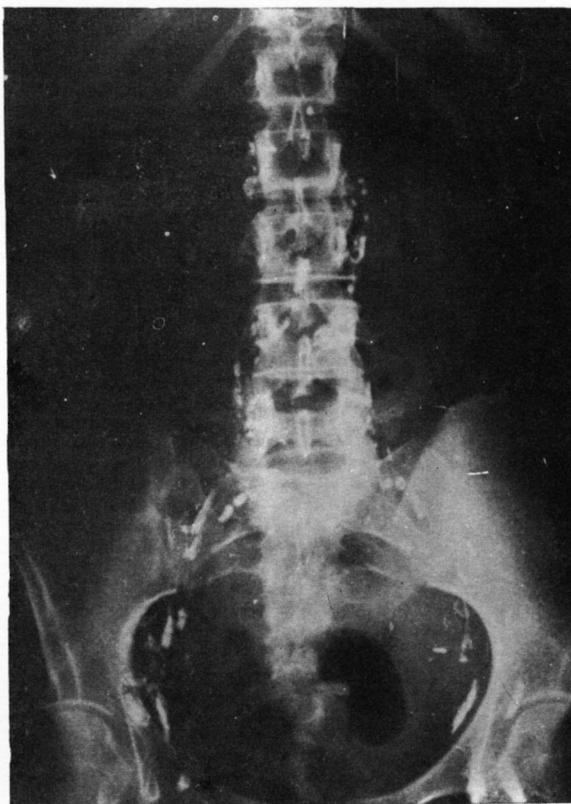


Figura 11 - Radiografia simples de abdome, da paciente HRO, 30 dias após irradiação endolinfática.

jeção do material radioativo. Na tabela 7 estes sintomas estão relatados por ordem de frequência. Urge assinalar, que os mesmos não persistiram além da primeira semana pós-irradiação.

8 - Determinação da meia vida efetiva -

Os valores líquidos da soma das contagens das posições supina e prona, expressos como percentagem dos valores da medida inicial, foram lançados na ordenada funcional de um gráfico semi-logarítmico. A função que melhor se adaptou foi traçada e seu $t_{1/2}$ foi determinado, resultando em média o valor de 7,6 dias. O caso MDC acha-se representado na figura 12.

T A B E L A 6

Cultura de linfócitos periféricos:

índices de estimulação = PHA/C

Paciente	Controle dia 0	Dias pós-irradiação			
		7	14	21	30
EMC	74,1	24,2	15,0	37,1	47,2
EOL	33,1	16,8	44,6	36,6	21,4
MR	26,7	42,2	41,4	21,0	21,4
SN	21,3	10,5	6,2	5,2	6,7
NER	138,5	76,8	119,6	134,4	77,9
SMA	29,3	30,4		16,5	8,4
HRO	59,8	16,5	32,4	68,0	79,9

PHA = fitohemaglutinina

C = controle sem PHA

Cálculos dosimétricos:

dose β :

gânglios = 34393 r
 tireoide = 100 r
 corpo total = 55 r

dose γ :

gânglios = 12000 r
 corpo total = 37,7r

T A B E L A 7

Efeitos colaterais

sinais e sintomas pós-irradiação	incidência	frequência
edema local	4	44,4%
dor local	3	33,3%
cefaléia	2	22,2%
infecção local	2	22,2%
febre	2	22,2%
mal-estar	1	11,1%
dor em membros inferiores	1	11,1%

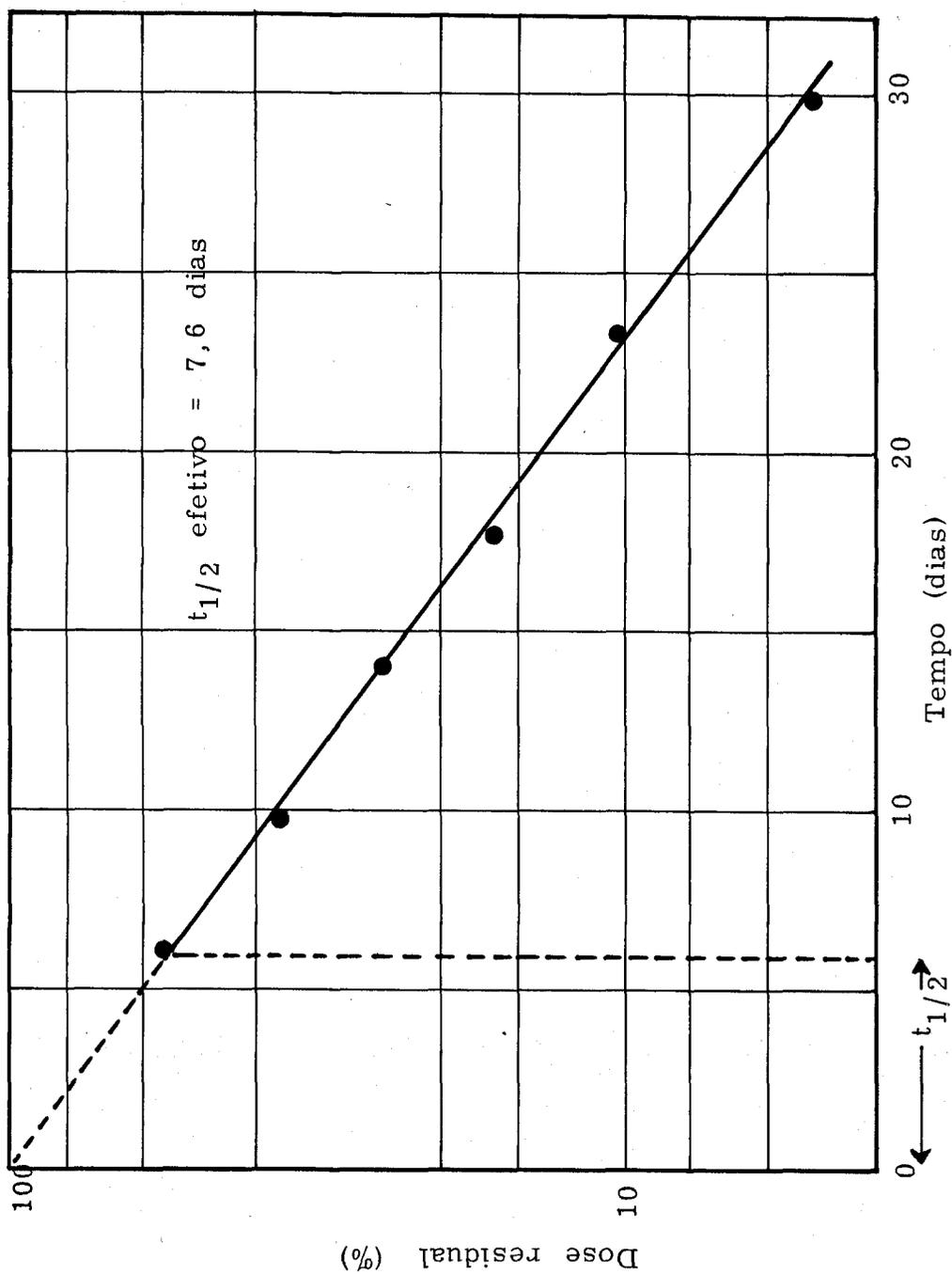


Figura 12 - Dose residual (%) de I^{131} do paciente MDC

IV - DISCUSSÃO

O presente estudo foi limitado ao intervalo de tempo que se estende desde a introdução do Lipiodol marcado até o trigésimo dia. Êste limite foi estabelecido como representativo do período que permitia a mais completa uniformidade de condições para os indivíduos envolvidos na investigação. Por outro lado, do ponto de vista clínico, pacientes que aguardam transplante não têm, em geral, condições para uma espera muito longa, portanto uma medida preparatória imunossupressora que demande um prolongado período para se tornar efetiva perde sua razão de ser. Interessa, por

tanto, estudar os efeitos do método a curto prazo.

A experiência pregressa com o uso terapêutico de I^{131} autorizava a observação dentro do prazo de 30 dias, pois é sabido que um tecido onde se acumula (tireóide) ou se deposita (linfonódio) o efeito da irradiação se manifesta a partir de 24 a 48 horas e é pleno quando ocorridos 4 a 8 dias.

A irradiação age localmente no linfonódio afetando linfócitos que por ali recirculam e impede proliferação de linfócitos B nos centros germinativos e T na região paracortical.

A queda de linfócitos periféricos tem sido referida em inúmeros trabalhos experimentais e clínicos como consequência da irradiação local (25, 48) do sangue circulante (55) ou irradiação direta do sistema linfático (45, 51, 52,). Hoje é bem claro o papel do linfócito na imunidade, em transplantes. A produção de anticorpos e a destruição do enxerto estão relacionados com a sua função. A linfopenia induzida pela irradiação do sangue circulante, diminui a resposta imunológica do cão a proteínas estranhas e prolonga o período funcional do órgão transplantado.

Todos os pacientes por nós estudados mostraram nítida queda no número de linfócitos. A paciente SMA apresentou queda linfocitária paralela à dos demais pacientes, mantendo entretanto níveis altos, em números absolutos, nas contagens totais de linfócitos periféricos (tabela 2). Este fato poderia ser justificado por dois fatores: a referida paciente era a única criança do grupo estudado e além disso encontrava-se em tratamento com hidantoina, droga essa que

pode determinar linfocitose (22).

Queda de linfócitos T também foi observada em pacientes com carcinoma de mama que receberam irradiação paraesternal. Stjernswaid e colaboradores(48) encontraram uma dissociação nos valores de T e B com que da altamente significativa de T e aumento da proporção das células B. Entretanto seus dados não podem ser interpretados nas condições em que o autor realizou os testes para EAC - a 20°C - pois a esta temperatura ocorre também adesão à custa de E, fato que não ocorre nas condições por nós empregadas, isto é, a 37°C.

A queda predominante de T sobre B (tabelas 3 e 4) no presente trabalho leva-nos a supor que a irradiação endolinfática deprimiria fundamentalmente a imunidade de tipo celular da qual a célula T parece ser o principal efector (8) embora também atue sobre células B, destruindo-as ao nível dos nódulos linfáticos.

As células que respondem à PHA parecem também ser de origem tímica entretanto apesar de no presente estudo se ter encontrado redução de células T, não houve inibição da resposta à PHA. É provável que a depressão havida não tenha sido em nível suficiente para abolir tal resposta, o que em geral só ocorre na ausência completa de células T, ou de fatores que impeçam sua estimulação.

Nossos achados confirmam dados da literatura sobre os efeitos da irradiação nos nódulos linfáticos. O linfonódio após a irradiação apresenta marcada depleção dos linfócitos e desaparecimento de centros germinativos

e região paracortical. O tamanho se reduz e se desenvolve acentuada fibrose com hialinização (34, 44). Finalmente perde totalmente sua estrutura e não se recupera (50), enquanto que os vasos linfáticos suportam altas doses de radioatividade sem apresentar alteração nem solução de continuidade.

A adesão de E e EAC foi praticamente abolida, evidenciando a perda de células imunologicamente competentes ao nível dos linfonódios.

Vários autores têm demonstrado alterações de Imunocompetência na uremia (14, 28, 53, 54), alterações estas que parecem estar mais relacionadas com a imunidade do tipo tardio. Provavelmente, um fator tóxico retido no plasma urêmico é o responsável por esta deficiência imunológica (32).

Os pacientes que apresentaram positividade dos testes de hipersensibilidade tardia pré - irradiação, os negativaram após, exceto um que, coincidentemente - apresentava "cross-match" positivo contra linfócitos de indivíduos normais. A irradiação poderia suprimir a resposta de hipersensibilidade tardia por destruição de grande parte do contingente de células imunologicamente competentes, comprometidas para o antígeno, em questão, ao nível do linfonódio.

O método utilizado mostrou-se de simples execução e inócuo. Os efeitos colaterais imediatos, diretamente relacionados à injeção do isótopo incidiram em baixa frequência e não foram, em geral, de grande importância clínica. Não persistiram por mais de uma semana, via de regra limitando-se aos três primeiros dias. Os dados aqui apresen

tados coincidiram com ampla experiência relatada pela literatura (10, 16, 46).

Por outro lado, os efeitos resultantes da irradiação direta sobre tecidos e órgãos extra-linfáticos radio-sensíveis nas proximidades de massas linfóides fortemente irradiadas é nula graças à predominância de emissão β , partícula de pequena penetração em tecidos moles. A quantidade de Lipiodol que chega aos pulmões é mínima e sua vida média nesse local é encurtada para 5 dias (42). A fixação na tireóide é muito pobre podendo ser ainda minimizada pelo prévio bloqueio do órgão com iodeto de sódio. A irradiação de órgãos pélvicos é igualmente insignificante, havendo casos relatados na literatura de curso normal de gravidez pós-irradiação (42). A irradiação hemática é praticamente nula e a medula óssea não parece ser atingida (7).

A possibilidade de uma radioatividade intensa e persistente no local desejado com insignificante ou nula irradiação dos demais tecidos, amplia as vantagens terapêuticas ou imunossupressoras da irradiação endolinfática.

Conhecida a incidência da leucemia nos sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki (5, 6) convém analisar o aspecto da relação leucemia-irradiação. Levantamento feito em pacientes com tireotoxicose tratados com I^{131} mostrou que neste grupo, como na população geral, a incidência foi ocasional (39). Em estudos feitos em pacientes submetidos à radioatividade, a incidência de leucemia pareceu ser nitidamente dose dependente (21, 36).

A possibilidade da irradiação provo-

car maior risco para o aparecimento de neoplasias não deve ser relegada a um segundo plano, pois trabalhos recentes ressaltam a incidência eventualmente maior de cancer em pacientes com deficiências imunológicas (41).

Colocados estes pontos é ressaltado o papel da vigilância exercida pelo sistema linfóide e a importância das consequências que podem advir de uma depressão da capacidade de resposta imunitária, seja qual for a sua natureza.

V - C O N C L U S Õ E S

Estudando a resposta imunológica de 9 pacientes à irradiação endolinfática, concluiu-se que houve:

- 1 - queda significativa de linfócitos periféricos e dos linfócitos tipo T e B;
- 2 - destruição completa e definitiva dos linfonódios atingidos pela irradiação, com perda de células imunologicamente competentes, avaliadas por ausência de aderência de E e EAC;
- 3 - inibição da resposta de hipersensibilidade tardia "in vivo".

Em consequência das 3 conclusões acima e em face da inocuidade do método, o mesmo tem sua indicação reforçada como medida de preparo imunossupressor em transplante de órgãos.

VI - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ARIEL, I.M.; RESNICK, M.I.; GALEY, D. - The intralymphatic administration of radioactive isotopes and cancer chemotherapeutic drugs. *Surgery* 55: 355-63, 1964.

- 2 - BACH, F.H.; HIRSCHHORN; K. - The "in vitro" immune response of peripheral blood lymphocytes. *Seminars Hemat.* 2: 68-89, 1965.

- 3 - BIANCO, C.; PATRICK, R.; NUSSENZWEIG, V. - A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement, complexes, J. Exp. Med. 132: 702-20, 1970.
- 4 - BLAKE; J. - Difficulty in clinical assessment of lymph nodes after endolymphatic radio-iodine. Postgrad Med. J. 44: 336-38, 1968.
- 5 - BIZZOZERO, Jr. O.J.; JOHNSON, K.G.; CIOCCO, A.; HOSHINO, T.; ITOGA, T.; TOYODA, S.; KAWASAKI, S. - Radiation related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-64. I. Distribution, incidence and appearance times. New Engl. J. Med. 274 : 1095-101, 1966.
- 6 - BIZZOZERO, Jr. O.J.; JOHNSON, K.G.; CIOCCO, A.; KAWASAKI; S.; TOYODA, S. - Radiation related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-64. II. Observations on type-specific leukemia. Survivorship and clinical behavior. Ann. Intern Med. 66: 522-30, 1967.
- 7 - BUCALLOSSI, P. - Trattamento con radioisotopi introdotti per via endolinfatica. Minerva Med., 58: 4509-10, 1967.
- 8 - CEROTTINI, J.C.; NORDEN, A.A.; BRUNNER, K.T. - "In vitro" cytotoxic activity of thymus cells sensi-

zed to alloantigens. Nature 227: 72,73, 1970.

- 9 - CHIAPPA, S. - Lymphangiography in the diagnosis of retroperitoneal node metastases in rectal cancer. Brit. J. Radiol. 40: 584-92, 1967.
- 10- CHIAPPA, S.; BONADONNA, G.; USLENGHI, C.; MARANO, P.; MOLINARI, R. - The role of endolymphatic radiotherapy in the treatment of chronic lymphatic leukemia. Brit. J. Cancer 20: 480-84, 1966.
- 11- CHIAPPA, S.; GALLI, G.; PALMIC, C. - Observations on intralymphatic radiotherapy and general chemotherapy. Clin. Radiol. 15: 202-9, 1964.
- 12-- CHIAPPA, S.; USLENGHI, C.; GALLI, G.; RAVASI, G.; BONADONNA, G. - Lymphangiography and endolymphatic radiotherapy in testicular tumours. Brit. J. Radiol. 39: 498-12, 1966.
- 13- CHIBA, C.; KONDO, M.; ROSENBLAT, M.; WOLF, P. L.; BING, R. J. - The selective irradiation of canine lymph nodes by means of intralymphatic injection of P^{32} . Transplantation 5: 232-40, 1967.
- 14- CHOCAIR, P.R.; CROCE, J. SABBAGA, E. - Verificação de sensibilidade tardia na uremia. Rev. Ass. Med. Bras. 17: 283-84, 1971.
- 15- COEUR, P. - Simple and radioisotope lymphography in chronic lymphatic leukemia. Nouv. Rev. Franç.

Hemat. 9: 409-18, 1969.

- 16- CROIZAT, P.; REVOL, L.; PAPILLON, J.; CHASSAD, J.L.; VIALA, J.J.; BRYON, P.A.; LAHNECHE, B.; VEROT, R. - La Lymphographie radio - active dans 71 cas de maladie de Hodgkin observés depuis des ans. Résultats, indications. Nouv. Rev. Franç. Hemat. 9: 316-23, 1969.
- 17- CRONKITE, E. P. - Extracorporeal irradiation of the blood and lymph in the treatment of leukemia and for immunosuppression. Ann. Intern Med. 67: 415-23, 1967.
- 18- DUKOR, P.; BIANCO, C.; NUSSENZWEIG, V.- Tissue localization of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen - antibody - complement complexes. Proc. Nat. Acad. Sci. 67: 991-97, 1970.
- 19- EDWARDS, J.M. - The value of lymphography in the management of melanoma. Clin. Radiol. 20: 444-46, 1969.
- 20- GRANDVAL, C.M.; DEL RIO, H.G. - Radioterapia en dolinfática en la recidiva perineal del cancer del rec

- to. Pren méd. argent. 57: 629-32, 1970.
- 21- GUNZ, F. W.; ATKINSON, H.R. - Medical radiations and leukemia: a retrospective survey. Brit. Med. J. 1: 389-93, 1964.
- 22- HYMAN, G.A.; SOMMERS, S.C. - The development of Hodgkin's disease and lymphoma during anticonvulsant therapy. Blood 28: 416-27, 1966.
- 23- JANTET, G.H. - Direct intralymphatic injections of radioactive colloidal gold in the treatment of malignant disease. Brit. J. Radiol. 35: 692-97, 1962.
- 24- JOEL, D.D.; CHANANA, A.D.; CRONKITE, E.P.; - SCHIFFER, L.M. - Modification of skin allograft immunity by extracorporeal irradiation of lymph. Transplantation 5: 1192-97, 1967.
- 25- KAUFFMAN, H.M.; CLEVELAND, R.J.; DWYER, J. J.; LEC, H.M.; HUME, D.M. - Prolongation of renal homograft function by local graft radiation. Surg. Gynec. Obstet. 120: 49-58, 1965.
- 26- KIEFFER, J. - Descrição característica e desempenho

de um protótipo de contador de corpo inteiro para uso clínico. São Paulo 1970. Tese dout - Faculdade de Medicina da U.S:P.

- 27- KIEFFER, J.; SABBAGA, E.; BARBERIO, J.C. - Lipidol endolinfático como medida imunossupressora de receptores de transplante renal. Congresso de la Association Latino-americana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, 2º Mar del Plata, 1968.
- 28- KIRKPATRICK, C.H.; WILSON, W.E.C.; TALMAGE, D.W. - Immunologic studies in human organ transplantation. I Observation and characterization of suppressed cutaneous reactivity in uremia. J. Exp. Med. 119: 727-42, 1964.
- 29- LAY, W.H.; MENDES, N.F.; BIANCO, C.; NUSSENZWEIG, V. - Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. Nature 230: 531-32, 1971.
- 30- LAY, W.H.; NUSSENZWEIG, V. - Receptors for complement on leukocytes. J. Exp. Med. 128: 991-09, 1968.
- 31- LIEBNER, E.J.; HAAS, R.E.; LEROY, E.P. - Experimental therapeutic intralymphatic studies. Cancer 18: 827-42, 1965.

- 32- LIMA, J.J.G. - O efeito da urina e do soro de pacien
tes urêmicos sobre cultura mista de linfócitos - São
Paulo, 1972. (Tese dout - Faculdade de Medicina
da U.S.P.)
- 33- LIMA, J.J.G.; KIEFFER, J.; LEDERMANN, M.; SABB
BAGA, E. - Irradiação endolinfática em transplant
te renal. Congresso Brasileiro de Nefrologia, 5º São
Paulo, 1970.
- 34- MATTEA, E.; CHIAPPA, S.; PIZZETTI, F.; BONO,
A.V.; GALLI, G. - La radioterapia endolinfatica
con lipiodol I¹³¹ nel carcinoma della vescica. Urolo
gia 31: 167-89, 1964.
- 35- MENDES, E.; RAPHAEL, A. - Impaired delayed hi-
persensitivity in patients with South American blast
tomycosis. J. Allergy 47: 17-22, 1971.
- 36- MODAN, B.; LILIENTFELD, A.M. - Polycythemia vera
and leukemia - the role of radiation treatment. Me
dicine 44: 305-44, 1965.
- 37- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.;
BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. - Chromos
ome preparations of leukocytes cultured from human
peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20: 613-16 ,
1960.

- 38- NASPITZ, C.K.; RICHTERS, M. - The metabolism of phytohemagglutinin during incubation with human peripheral lymphocytes. Brit. J. Haemat. 15: 77,85, 1968.
- 39- POCHIN, E. - Leukemia following radioiodine treatment of thirotoxicosis. Brit. Med. J. 2: 1545-50, 1960.
- 40- QUIMBY, E.H.; FEITELBERG, S.; SILVER, S. - Radioactive isotopes in clinical practice. Philadelphia Lea & Febiger, 1959. p. 91.
- 41- Radiation, immunity and cancer. Lancet, 2: 217 - 18, 1972.
- 42- RATTI, A. - La somministrazione per la via dei linfatici di isotopi radioattivi a scopo terapeutico. Minerva Med. 57: 4440-45, 1966.
- 43- ROMIEU, C.; PUJOL, H.; LAMARQUE, J.L. - La lymphographie radio-active dans la thérapeutique des hémopathies malignes. Bull. Ass. Franç. Cancer 51: 433-46, 1964.

- 44- SEITZMAN, D.M.; HALABY, F.A.; FLANEGAN, P.;
WRIGHT, R.; FREEMAN, J.H. - Intralymphatic
radioisotope therapy. Surg. Gynec. Obstet. 118:
52-8, 1964.
- 45- SHIKATA, T. - Selective irradiation of lymphnodes with
transitory ligation of the thoracic duct as immunosu
ppressive measure in renal transplantation. Tohoku
J. Exp. Med. 94: 55-61, 1968.
- 46- SIEGEL, P.; LIEBNER, E.J. - Intralymphatic radio-
active therapy for pelvic cancer. Amer. J. Obstet.
91: 122-31, 1965.
- 47- SILVEIRA, N.P.A.; MENDES, N.F.; TOLNAI, M.E.
A. - Tissue localization of two populations of lym
phocytes distinguished by membrane receptors. J.
Immunol. 108: 1456-60, 1972.
- 48- STJERNSWARD, J.; VANKY, F.; JONDAL, M.;
WIGZELL, H.; SEALY, R. - Lymphopenia and
change in distribution of human B and T lymphocytes
in peripheral blood induced by irradiation for mam-
mary carcinoma. Lancet 1: 1352-56, 1972.
- 49- SZABÓ, G.; MAGYAR, Z.; BALINT, J. - Prolonga
tion of skin homograft survival by local intralympha
tic radioisotope injections. Experientia 24: 70-71,
1968.

- 50- TILAK, S.P.; HOWARD, J.M. - Regeneration and autotransplantation of lymph nodes. Ann. Surg. 161: 441-46, 1965.
- 51- TILAK, S.P.; SALAK, W.W.; HOWARD, J.M. - Direct Irradiation of lymph nodes with ^{131}I tagged Ethiodol. Ann. Surg. 163: 67-73, 1966.
- 52- WHEELER, J.R.; WHITE, W.F.; CALNE, R.Y. - Selective lymphopenia by use of intralymphatic Au^{198} and splenectomy. Immunosuppressive action on rejection of canine renal homografts. Brit. Med. J. 2: 339-42, 1965.
- 53- WILSON, W.E.C.; KIRKPATRICK, C.H.; TALMAGE, D.W. - Immunologic studies in human organ transplantation. III The relationship of delayed cutaneous hypersensitivity to the onset of attempted kidney allograft rejection. J. Clin. Invest. 43: 1881-91, 1964.
- 54- WILSON, W.E.C.; KIRKPATRICK, C.H.; TALMAGE, D.W. - Suppression of immunologic responsiveness in uremia. Ann. Intern. Med. 62: 1-14, 1965.
- 55- WOLF, J.S.; O'FOLGHLUDHA, F.T.; KAUFFMAN, H.M.; HUME, D. M. - Prolongation of renal homograft survival by indwelling beta irradiation. Surg-Gynec. Obstet. 122: 1262-68, 1966.