

BASES ANATÓMICAS DA DEPURAÇÃO PLEURAL

ESTUDO EXPERIMENTAL

António Manuel de Sousa Pereira

**Porto
1993**

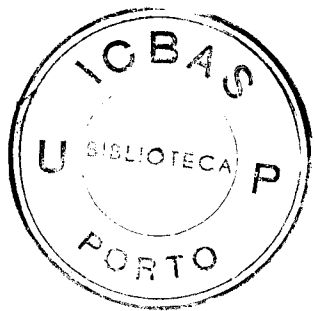


ANTÓNIO MANUEL DE SOUSA PEREIRA

BASES ANATÓMICAS DA DEPURAÇÃO PLEURAL

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas, especialidade de Morfologia Normal, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, sob a orientação do Professor Doutor Nuno Rodrigues Grande e co-orientação do Doutor Artur Perez Águas

Resultante, em parte, de trabalho desenvolvido no âmbito do projecto "Mediadores moleculares e celulares da Fibrose pulmonar" subsidiado pela JNICT (PMCT/C/SAU/44/90)



À memória de meu PAI

À minha MULHER
Aos meus FILHOS

Preceitos legais:

De acordo com o nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, foram utilizados para esta tese resultados contidos nos seguintes trabalhos:

Pereira AS, Grande NR. A new method for the study of lung lymphatics. Em *Lymphology: Advances in Europe*. ECIG Edts. Itália, pp 331-334, 1989

Pereira AS, Grande NR, Ribeiro A, Silva C, Monteiro E. Experimental study of clearance of particles from the pleural space. *Surgical and Radiological Anatomy* 13(2);S27, 1991.

Pereira AS, Grande NR. Particle clearance from the canine pleural space into thoracic lymph nodes: an experimental study. *Lymphology* 25:120-128, 1992

Pereira AS, Grande NR, Carvalho E, Ribeiro A. Evidence of drainage of tungsten particles introduced in the pleural space through the visceral pleura into the lung parenchyma. *Acta Anatomica*, 145: 416 - 419, 1993

Pereira AS, Peão MN, Grande NR. Enzyme - Histochemical Study of Lymphatic Capillaries in Lung Parenchyma. *European Journal of Lymphology and Related Problems* (em impressão).

Pereira AS, Águas AP, Cabral JM, Grande NR. Modulation of the reactivity of pleural milky spots: an experimental study in the rat. Submetido a publicação

Para o cumprimento do disposto naquele Decreto-Lei, declaro ser da minha responsabilidade o planeamento e execução das experiências que permitiram a obtenção dos resultados apresentados, a sua interpretação e discussão, bem como a redacção dos trabalhos referidos, sem prejuízo do acompanhamento crítico constante dos restantes coautores.

PREFÁCIO

A apresentação de uma dissertação de candidatura à obtenção do grau de Doutor representa um marco importante na vida de um docente Universitário. Para lá dos aspectos formais a obtenção do grau de Doutor corresponde ao reconhecimento da capacidade científica do candidato como investigador e constitui prova da sua maturidade. O caminho que leva à apresentação da dissertação não é, no entanto, um caminho solitário e o resultado final não pode ser visto como um trabalho estritamente pessoal mas como o fruto de uma colaboração e de um trabalho de grupo que importa realçar, tanto mais quando esse grupo é orientado pelo Professor Doutor Nuno Grande, exemplo perfeito de Universitário, nas suas vertentes de docente, investigador e humanista.

Ao Professor Doutor Nuno Grande, como responsável pela minha formação académica e de investigador, não podia pois deixar de expressar o meu reconhecimento pelo facto de ter deixado que fosse meu privilégio integrar a sua equipa docente e de investigação. Ao longo do período em que decorreu a elaboração desta dissertação o seu apoio a sua disponibilidade e a sua amizade foram constantes, sendo a sua participação criativa fundamental para o atingir dos resultados.

A programação das experiências e a interpretação dos resultados incluídos nesta dissertação foi ainda discutida e acompanhada constantemente pelo Doutor Artur Águas, meu companheiro de trabalho, a quem sinceramente agradeço e dedico o meu maior apreço e amizade.

Gostava também de incluir neste agradecimento o Doutor José Teixeira Gomes. Com ele dei os meus primeiros passos na Anatomia e dele recebi um forte estímulo para que em altura menos propícia não tivesse abandonado a docência universitária.

Os meus agradecimentos estendem-se ainda a todos os membros do Sector de Anatomia Normal do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar que comigo têm colaborado, em particular aos técnicos Emanuel Monteiro, Costa e Silva, António Moreno, José Aurélio e Duarte Monteiro. À Maria João Oliveira, bolseira da Junta Nacional de Investigação Científica integrada no projecto de investigação liderado pelo professor Nuno Grande agradeço também a colaboração prestada. Uma palavra de apreço para aqueles que pertencendo a outros sectores da nossa Escola deram um contributo importante para esta dissertação. Salientam-se de entre estes os membros do Serviço de Cirurgia Experimental do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, particularmente o senhor Alfredo Ribeiro e os funcionários da Biblioteca Alberto Saavedra do ICBAS em particular a senhora D^a Maria do Carmo Lucena Coutinho a quem devo uma grande ajuda na obtenção da bibliografia que representa como se compreende um dos aspectos mais importantes em investigação. Ao Serviço de Radiologia Central da Hospital Geral de Santo António na pessoa da técnica Luísa Nogueira e ao Serviço de Neuroradiologia na pessoa do técnico A. Lagrifa agradeço também a colaboração prestada.

À senhora Dr^a Nazaré Rego da Reitoria da Universidade do Porto desejo agradecer o apoio informático que disponibilizou bem como todo o interesse e dedicação com que colaborou no arranjo tipográfico desta dissertação.

Pelo Decreto Lei nº 388/70, Artº 8º, parágrafo 2 é permitido na elaboração da dissertação de candidatura ao grau de Doutor aproveitar total ou parcialmente os resultados de trabalhos publicados. Ao abrigo desta disposição os capítulos 2 a 5 desta dissertação são constituídos por artigos publicados, em impressão ou submetidos para publicação em revistas internacionais. Pareceu-nos ser esta uma opção correcta pois se por um lado

não é hoje legítimo contemporizar na publicação dos resultados obtidos sob pena de eles serem ultrapassados na sua actualidade, por outro esses trabalhos foram já discutidos na sua actual forma por revisores que embora anónimos se presume especialistas na matéria sobre a qual deram parecer. Uma alteração da forma de apresentação dos resultados e da discussão para dar uma forma unitária clássica de apresentação da dissertação de doutoramento, corria pois o risco de desvirtuar o trabalho, risco que não quisémos correr. Decidimos no entanto fazer uma introdução geral e uma discussão conjunta chamando a atenção para os pontos mais importantes por forma a estabelecer um fio condutor entre os vários trabalhos apresentados.

ÍNDICE

1. Introdução	13
2. Morfologia do Sistema Linfático do Pulmão	33
2.1. Um novo método para estudo dos linfáticos pulmonares	35
2.2. Morfologia do sistema linfático do pulmão humano	41
2.3. Estudo enzimo-histoquímico dos capilares linfáticos pulmonares	47
3. Papel da célula mesotelial visceral na depuração do espaço pleural	65
4. Papel dos vários grupos ganglionares torácicos na depuração do espaço pleural	71
5. Estrutura e função das manchas leitosas da pleura	83
6. Discussão	111
6.1. A escolha do modelo experimental	113
6.2. Comentários às técnicas utilizadas	115
6.3. A escolha do marcador utilizado	116
6.4. Resposta da cavidade pleural	117
6.5. Avaliação do desempenho da célula mesotelial	118
6.6. Envolvimento dos vasos linfáticos pleuropulmonares	121
6.7. Envolvimento ganglionar local versus regional	123
6.8. Manchas leitosas	125
7. Implicações clínicas e perspectivas futuras	129
8. Conclusões	135
9. Summary	139
10. Bibliografia	143

1

INTRODUÇÃO

A cavidade pleural é definida como o espaço virtual limitado pelos folhetos visceral e parietal da pleura. As suas paredes têm origem na mesoderme da cavidade celômica primitiva, juntamente com os folhetos que revestirão as cavidades pericárdica e peritoneal. A compartimentação da cavidade celômica em cavidades pleural e peritoneal é feita inicialmente pelo desenvolvimento do septo transversal da somatopleura ventral e mais tarde pelas pregas pleuroperitoneais esquerda e direita da somatopleura dorsal. A separação da cavidade pericárdica faz-se pelo fecho das pregas pleuropericárdicas direita e esquerda. Este processo completa-se por volta do terceiro mês de gestação. A partir desta altura, o desenvolvimento da cavidade pleural é condicionado pelo crescimento do pulmão verificando-se uma expansão da pleura nas direcções cranial, caudal e ventrolateral, circundando parcialmente o pericárdio (Gray e Skandalakis, 1985). A cronologia do desenvolvimento embrionário da cavidade pleural é sistematizada na Tabela 1.

O espaço pleural é extremamente delgado (7-25 μm) e está preenchido por um filme de líquido viscoso com uma concentração proteica de 1.06-1.30 g por 100 ml, com 57-78% de albumina (Pinchon et al, 1981) e que tem por função facilitar o deslizamento do pulmão, revestido pela pleura visceral, no interior da cavidade torácica, revestida pela pleura parietal. Esta diminuição do atrito pulmão-torax durante os movimentos respiratórios é conseguida graças à acção lubrificadora do líquido pleural que minimiza as perdas energéticas durante o deslizamento e maximiza a transmissão de forças da parede torácica ao pulmão (Lai-Fook, 1991). Esta função, embora importante, não é, no entanto, imprescindível, já que existem mamíferos que não possuem cavidade pleural. É disso exemplo o elefante, animal em que a cavidade serosa pleural é substituída por uma camada de tecido elástico que se interpõe entre o pulmão e a parede costal (Johnston e Dohnarsky, 1980). Também no homem pode ocorrer coalescência patológica dos dois folhetos pleurais, quer de origem iatrogénica (através da injeção intrapleural

de substâncias irritantes, como a tetraciclina, talco, mostarda nitrogenada e ciclofosfamida) quer como consequência de processos inflamatórios envolvendo a cavidade pleural. Nestas situações, o desaparecimento total ou parcial da cavidade pleural não acarreta necessariamente um compromisso funcional significativo da função pulmonar (Johnston e Dohnarsky, 1980). Por outro lado, múltiplas patologias, sem aparente relação com a função respiratória, apresentam manifestações pleurais importantes sugerindo que a fisiologia da pleura e cavidade pleural não se reduz a uma participação passiva na mecânica respiratória. Incluem-se nestas patologias as reacções inflamatórias imunes do tipo III, causadas pela deposição de imunocomplexos, e de tipo IV, reconhecimento de antígenos exógenos por células T e lesão causada pela libertação de mediadores solúveis como p.e. linfoquinas. São exemplo do primeiro tipo de reacção o envolvimento pleural na artrite reumatóide, no lúpus eritematoso disseminado e provavelmente na granulomatose de Wegener, e do segundo tipo o derrame pleural na tuberculose primária envolvendo interacção entre o *mycobacterium tuberculosis* e linfócitos sensibilizados na pleura (Kinasewitz e Fishman, 1988).

Este envolvimento pleural em patologias tão diversas constitui um motivo adicional para que se proceda ao estudo desta estrutura procurando contribuir para avanços no conhecimento da sua anatomofisiologia e fisiopatologia.

TABELA 1**EMBRIOLOGIA DA CAVIDADE PLEURAL**

Estadio Carnegie	Dias após ovulação	Desenvolvimento celômico
6	13	presença do celoma extra embrionário
8	18	espaços celômicos aparecem na região pericárdica
9	20	cavidades pericárdicas coalescem ao longo da linha média
10	22	comunicação do celoma intra e extra embrionário para formar a cavidade peritoneal
13	28	os pulmões invaginam a parede medial dos sacos pleurais
16	37	os canais pleuropericárdicos fecham
21	52	os canais pleuroperitoneais fecham
23	3º mês	as cavidades pleurais expandem-se cranialmente, caudalmente e ventrolateralmente para rodear o pericárdio

Adaptado de : Stephen Gray e John Skandalakis.
Development of the Pleura. The Pleura in Health and Disease

Anatomia Microscópica da Pleura

A pleura é constituída por uma monocamada de células mesoteliais aderentes a uma lâmina basal e assentes sobre tecido conjuntivo. No folheto parietal da pleura este epitélio simples pavimentoso assenta sobre uma camada de tecido

conjuntivo rico em colagénio e fibras elásticas contendo vasos sanguíneos e linfáticos e ainda numerosas terminações nervosas sensíveis à dor.

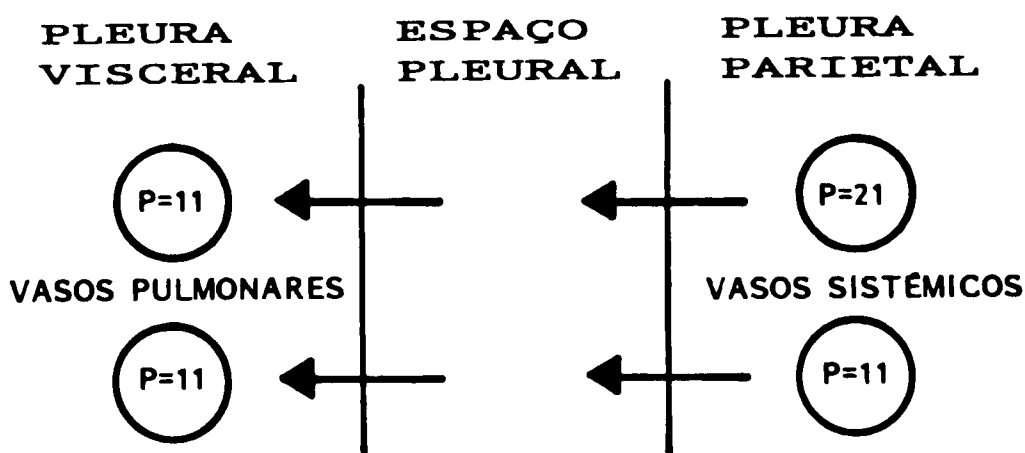
No folheto visceral o tecido conjuntivo submesotelial é caracterizado pela sua reduzida espessura e é constituído sobretudo por fibroblastos, histiócitos e escassas fibras de colagénio. É a chamada endopleura. Sob a endopleura encontra-se então tecido conjuntivo rico em colagénio e fibras elásticas. Estas fibras elásticas, ao contrário das de colagénio que se organizam em arranjos paralelos, formam uma rede irregular. Finalmente, sob a camada conjuntiva encontramos um rico componente vascular (intersticial) constituído por vasos sanguíneos e linfáticos.

Embora esta estrutura básica da pleura seja comum às várias espécies de mamíferos podem-se distinguir dois grupos de animais no que se refere à espessura relativa da pleura: os de pleura fina, de entre os quais se salienta o cão, animal frequentemente utilizado em estudos de fisiologia pleural, e os animais de pleura espessa entre os quais se encontra o Homem e também o carneiro e o porco.

Tem sido sugerido que esta diferença de espessura da pleura, particularmente da pleura visceral, deve ser tida em conta quando se pretendem generalizar para o homem conclusões de experiências realizadas em vários modelos animais. De facto, para alguns autores (McLaughlin e col, 1961) a circulação arterial da pleura visceral nos animais de pleura fina tem origem na circulação pulmonar, enquanto que nos animais de pleura espessa ela tem origem na circulação brônquica. Dada a diferença de pressões que se observa nestas duas circulações, fácil é deduzir a potencial importância desta diferença de estrutura pleural na fisiologia da cavidade serosa. Contudo, estudos mais recentes (Albertine e col., 1982; Mariassy e Wheeldon, 1983) parecem indicar que a irrigação da pleura visceral não se rege por conceitos tão estritos: num mesmo animal pode ser encontrada pleura de diferentes espessuras sendo estas variações dependentes

da excursão pleural durante o ciclo respiratório (Mariassy e Wheeldon, 1983). A hipótese que prevaleceu desta polémica (Pistolesi e col., 1989) é a de que a irrigação arterial do folheto visceral da pleura tem uma origem dupla, ou seja, recebe arteríolas quer da circulação brônquica quer da circulação pulmonar.

Esta reformulação de conceitos acerca da circulação arterial da pleura implica a revisão dos conceitos clássicos sobre a dinâmica da circulação do líquido pleural. De acordo com os modelos mais antigos (Fig. 1.1) a filtração de fluido pleural processar-se-ia ao nível da pleura parietal (devido à sua irrigação arterial ser feita à pressão sistémica) e a drenagem far-se-ia através da pleura visceral (com pressões inferiores no seu aporte vascular decorrentes da sua irrigação por ramos da artéria pulmonar). O conhecimento actual de que a pleura visceral tem uma irrigação mais complexa, de tipo misto com um componente dependente da circulação sistémica (Fig. 1.2), tornou premente a elaboração de novos protocolos experimentais para investigar a depuração de substâncias, quer líquidas quer



Agostoni, 1972

Fig1.1 - Dinâmica de formação e remoção do líquido pleural de acordo com o conceito clássico de que a circulação arterial da pleura visceral é inteiramente dependente da artéria pulmonar (Adaptado de Pistolesi, Miniati e Giuntini, 1989).

sólidas, a partir do espaço pleural.

Depuração Pleural

A depuração pleural de líquidos, electrólitos e partículas têm sido objecto de numerosos estudos atribuindo-se a Dybkowsky em 1866 a primazia na abordagem científica deste problema. Para este autor a absorção de partículas e líquidos presentes no espaço pleural far-se-ia através de estomas - espaços de comunicação entre a cavidade pleural e o lúmen linfático já descritos anteriormente numa outra serosa, a peritoneal por von Recklinghausen -, que existindo na cavidade pleural ao nível da pleura costal, como se ilustra na figura 1.3, permitiam a drenagem para vasos linfáticos da pleura parietal. Esta absorção através de estomas seria determinada pelos movimentos respiratórios. Aos vasos linfáticos da pleura

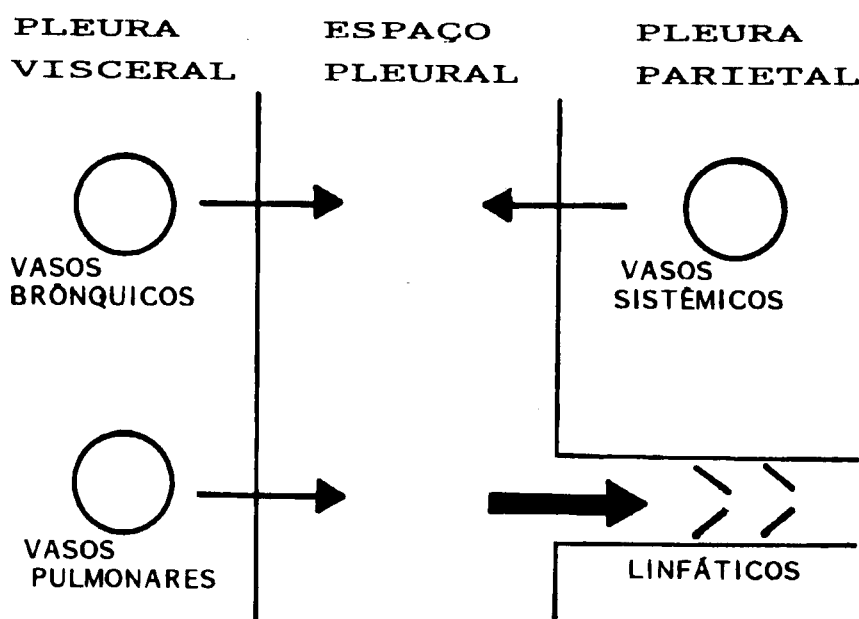


Fig1.2 - Dinâmica de formação e remoção do líquido pleural de acordo com os conhecimentos mais recentes acerca da natureza mista da circulação arterial da pleura visceral. Neste modelo proposto por Pistolesi, Miniati e Giuntini em 1989 assume também importância a presença ao nível da pleura parietal dos estomas.

visceral era atribuído um papel nulo neste processo de depuração pleural. Trabalhos subsequentes (Starling e Tubby, 1894; Dandy e Rowntree, 1914) levaram a interpretações que minimizavam o papel dos linfáticos na depuração do espaço pleural, atribuindo um papel preponderante neste processo aos vasos

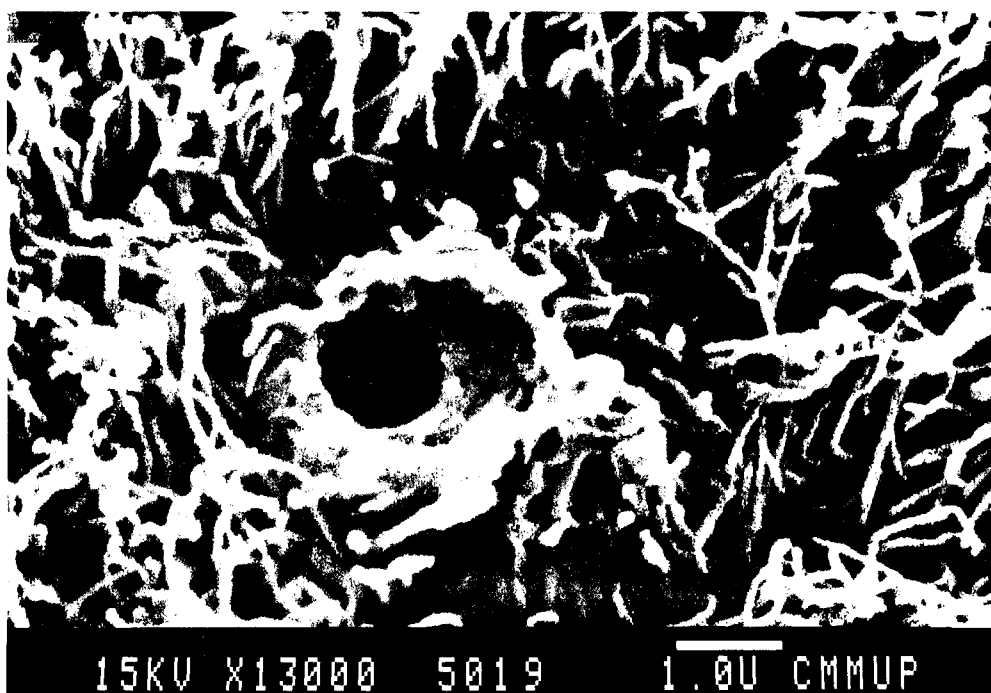


Fig1.3 - Estoma pleural. Fotografia obtida por microscopia electrónica de varrimento de fragmento de pleura costal. É bem evidente a bordadura cribiforme do estoma. Podem também observar-se as microvilosidades características das células mesoteliais que revestem a cavidade pleural.

sanguíneos. Estas propostas derivaram de um conhecimento incorrecto da anatomia do sistema linfático do torax pois eram baseadas no princípio de que os linfáticos pleurais drenavam na sua totalidade para o canal torácico o que é, como se sabe, incorrecto.

Em 1949, Courtice e Simmonds reinvestigaram este problema. Estes cientistas introduziram plasma corado na cavidade pleural do gato após canulação do canal torácico e de um outro canal linfático junto da base do pescoço (que se

presume ser a grande veia linfática). Eles observaram que nos animais em que foi canulado apenas o canal torácico era detectado corante na corrente sanguínea, enquanto que nos animais pertencentes ao grupo em que o canal torácico e a grande veia linfática foram canulados o corante não era detectado na corrente sanguínea, sendo recuperado na sua totalidade através das canulas introduzidas no canal torácico e na grande veia linfática. Concluíram estes autores que a drenagem linfática das cavidades pleurais se fazia predominantemente para a grande veia linfática, deste modo justificando o erro interpretativo dos autores dos finais do século passado que haviam postulado que a absorção do líquido pleural seria feita através dos vasos sanguíneos.

É interessante notar que no exame *post mortem* dos animais utilizados nestas experiências não se constatou a presença do marcador no parênquima pulmonar o que reforçou a ideia de que a absorção de substâncias presentes no espaço pleural se fazia predominantemente através dos linfáticos da pleura parietal. Trabalhos mais recentes (Nakamura e col, 1988) mostraram uma redução em 90% da taxa de remoção de líquido pleural após ligação da grande veia linfática e canal torácico o que confirmou mais uma vez o papel preponderante dos linfáticos pleurais na depuração do espaço ao qual estão associados.

Em 1949, Cooray voltou a estudar a depuração do espaço pleural, numa investigação que tinha como objectivo compreender a razão da baixa frequência de mediastinites no Homem apesar da frequência elevada de patologias pleuro-pulmonares. Com efeito numa série de 2808 autópsias realizadas no University College Hospital da Universidade de Londres foram encontrados apenas 22 casos de mediastinite apesar de haver 1 558 casos mostrando alterações inflamatórias do pulmão e pleura. Dado ser nessa altura já conhecido que a drenagem linfática da cavidade pleural se fazia pela pleura costal e mediastínica, foi postulada a existência de mecanismos locais de defesa do mediastino sendo estes procurados. Após uma série de experiências em animais de laboratório consistindo na

introdução na cavidade pleural de várias substâncias como tinta da china, azul de tripano, carmim de lítio, partículas de sílica, suspensões de glóbulos rubros de coelho, óleos vegetais e vários tipos de bactérias, Cooray descreveu o trajecto destes componentes no interior da cavidade pleural. Este investigador estabeleceu que os marcadores se distribuíam preferencialmente junto do mediastino inferior, com uma disseminação cefálica ulterior. Este tipo de localização de líquidos e partículas injectados na cavidade pleural foi recentemente confirmado (Miserocchi e col, 1984) através da injeção intrapleural de substâncias radioactivas cujo trajecto foi seguido por uma câmara de raios gama (fig. 1.4).

A acumulação de substâncias no mediastino caudal faz-se junto de duas pregas de pleura que unem o pericárdio ao diafragma e que têm o nome de pregas pleurais retrocardíaco-mediastínicas (fig. 1.5), em particular em áreas espessadas destas pregas (fig. 1.6) que correspondem às chamadas manchas leitosas ("milky spots"). Dado que sempre que injectava substâncias estranhas na cavidade pleural elas eram precocemente fagocitadas por macrófagos presentes nas manchas leitosas, não atingindo os tecidos mediastínicos, Cooray postulou que estas estruturas teriam um papel fundamental na defesa do mediastino relativamente

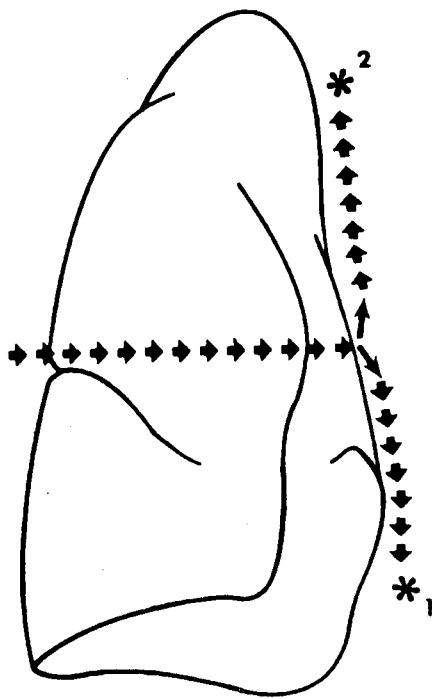


Fig1.4 - Esquema ilustrando o trajecto seguido por uma substância injectada na cavidade pleural. Ao fim de treze segundos há uma acumulação junto das áreas: 1 - retrocardíaca e 2 - paraesternal alta (Adaptado de Miserocchi e col, 1984)

a agressões oriundas da cavidade pleural. O autor obtinha deste modo uma explicação plausível para a baixa frequência de mediastinites encontrada na série de autópsias humanas com que iniciou estes estudos.

As manchas leitosas ("milky spots"), assim designadas na literatura anglo-saxónica devido ao seu aspecto punctiforme esbranquiçado, foram descritas pela primeira vez na cavidade abdominal por von Recklinghausen em 1873 e por Ranvier em 1874. A primeira documentação deste tipo de estruturas na cavidade pleural do Homem foi feita por Otto Kampmeier em 1928 (daí a designação de

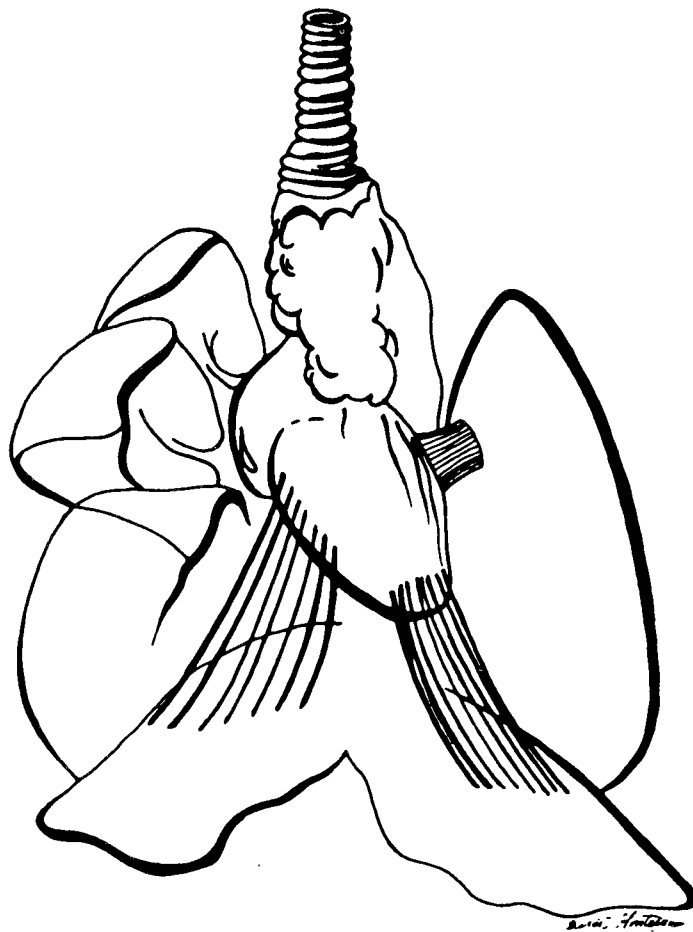


Fig.1.5 - Esquema ilustrando a localização das pregas pleurais retrocardíacomediastínicas. Estas pregas unem o coração ao diafragma. No homem não se encontram e no seu lugar existe uma fusão entre o pericárdio e o diafragma.

Focos de Kampmeier aplicada por vezes às manchas leitosas localizadas na pleura humana). No interior da cavidade torácica encontramos este tipo de estruturas localizadas preferencialmente no mediastino inferior junto dos grandes vasos e nervos (Kanazawa, 1985), e nas pregas pleurais retrocardíaco-mediastínicas e ligamento pulmonar (Mixer, 1941; Cooray, 1949; Lang, 1962,1965; Kanazawa e col, 1979). A localização junto dos grandes vasos do torax é particularmente importante no caso do Homem visto que em resultado de uma mais pronunciada rotação para a esquerda do coração durante o período fetal, as pregas atrás descritas rebatem-se sobre os grandes vasos do mediastino posterior, constituindo esta uma das localizações preferenciais das manchas leitosas na espécie humana. Também ao longo do rebordo inferior das costelas, na sua face endotorácica, podemos encontrar manchas leitosas, integradas nos chamados órgãos pleuro-adiposos (Hayek, 1970; Aharinejad e col, 1990). As manchas leitosas dos órgãos pleuro-adiposos aparecem em grande número nos recém



Fig1.6a - Fotografia obtida à lupa estereoscópica de prega pleural retrocardíacomediastínica de cão jovem. São numerosa as manchas leitosas por unidade de área, o que está em relação com a idade jovem do animal

nascidos, desaparecendo progressivamente à medida que o sistema imune da criança se vai modificando (Aharinejad e col, 1990).

As manchas leitosas aparecem como pequenas áreas, circulares ou ovais, de espessamento do folheto parietal da pleura, raramente atingem 1 mm de diâmetro e são revestidos por células mesoteliais de forma mais arredondada do que as restantes células mesoteliais que aparecem na pleura. Entre as células de revestimento das manchas leitosas encontram-se numerosos poros intercelulares (Mironov e col, 1979). Investigações por microscopia electrónica mostraram que as manchas leitosas são constituídas por um emaranhado de capilares sanguíneos de tipo fenestrado (Brandt e Schnorr, 1983; Hodel, 1970) com uma lâmina basal caracteristicamente pouco desenvolvida (Bartoszewicz e Dux, 1968). Os vasos são circundados por um conjunto heterogénio de células: macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, mastócitos, etc. No peritoneu humano a percentagem relativa de

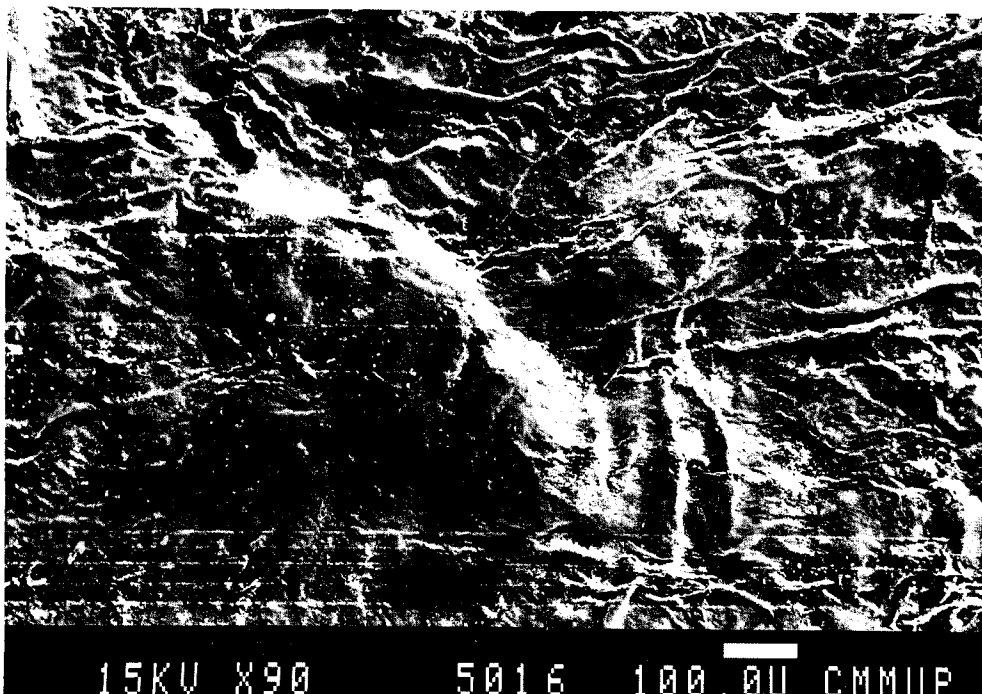


Fig1.6b - Aspecto em microscopia electrónica de varrimento de uma mancha leitosa. Tem forma elipsóide e faz saliência na superfície da pleura.

cada uma destas células foi recentemente definida (Shimotsuma e col, 1991): os

macrófagos constituindo cerca de 47% da população celular são o elemento mais numeroso, seguido do linfócito B (29%), linfócito T (12%) e mastócitos (6%). Foi também documentado que esta composição celular relativa se altera rapidamente em resposta a estímulos diversos introduzidos na cavidade serosa (Beelen e col., 1980).

A diversidade de aspectos que assumem as manchas leitosas quando observados no seu conjunto levou a que fossem sistematizadas segundo a sua forma (Kanazawa e col., 1979). Assim, as manchas leitosas podem ser divididas em 4 tipos diferentes: i) Intramembranoso - são ovóides ou elípticas e encontram-se nas zonas em que existe contacto entre duas superfícies mesoteliais podendo ser divididas em dois subtipos - vasculonodular e vasculomembranoso, sendo este último característico do ligamento gastroesplénico; ii) Séssil Marginal - o tipo mais numeroso encontrado ao longo de faixas adiposas e dos grandes vasos, tem a forma de uma flôr de hortênsia; iii) Pediculado - caracterizadas por possuírem um longo pedículo, aparecem sobretudo junto das raízes mesentéricas; iv) Solitário Pouco Vascularizado - aparece isolado e disperso pela pleura mediastínica, e possui uma vascularização diminuta e difícil de demonstrar. A estes diferentes padrões morfológicos não foram atribuídas diferenças funcionais pelo que o significado desta classificação está ainda por definir.

Mais importante que a forma é provávelmente o número de manchas leitosas o qual varia em função da idade. No peritoneu humano a contagem de manchas leitosas em diferentes idades (Shimotsuma e col., 1989) mostrou um número médio de manchas leitosas no grande epiplon de cerca de 40 por cm^2 entre o nascimento e o primeiro ano de idade diminuindo para cerca de 20/ cm^2 aos dois anos, 10/ cm^2 aos três anos e 2/ cm^2 nos adultos. A natureza da sua composição celular, alguma evidência de zonação e o facto de estes órgãos sofrerem uma atrofia progressiva à medida que há amadurecimento do sistema imunológico, levou a que fosse postulada para estes órgãos uma função idêntica à do timo

(Kotten e Otter, 1991). No entanto, a inexistência de áreas de linfócitos T e B bem definidas contradiz esta teoria; actualmente a interpretação mais defendida é a de que estes corpúsculos correspondam a tecido linfóide sem uma zonação bem definida dos seus linfócitos B e T (Beelen, 1992; Shimotsuma e Simpson Morgan, 1991).

Na pleura, as manchas leitosas localizam-se na pleura parietal e mediastínica estando ausentes na pleura visceral. O facto dos estomas estarem também confinados à pleura parietal sugere uma participação importante do folheto parietal na depuração do espaço pleural.

Os conceitos mais recentes sobre a depuração de substâncias presentes no espaço pleural indicam que:

I) Água, electrólitos e substâncias de pequeno peso molecular podem ser absorvidas pelos capilares sanguíneos da pleura visceral após atravessarem a célula mesotelial (Wang, 1974) ou através de junções intercelulares (Black, 1972);

II) As substâncias de maior peso molecular não são absorvidas pela pleura visceral (Astoul e col, 1990; Kanazawa, 1985).

Trabalho realizado por nós e publicado este ano (Pereira e col, 1992) demonstrou que, contrariamente aos conceitos correntes, a célula mesotelial da pleura visceral, é capaz de captar partículas presentes na cavidade pleural, aparecendo estas sucessivamente no tecido conjuntivo subpleural, no interior de linfáticos subpleurais, nos linfáticos peribroncovasculares e nos tecidos linfóides bronco-alveolares (BALT - Broncho Alveolar Lymphoid Tissue). Esta depuração do espaço pleural realizada pelas células mesoteliais da pleura visceral embora se possa revestir de importância em termos fisiopatológicos e terapêuticos, como se verá no Capítulo III, é, no entanto, um componente menor no processo global da depuração do espaço pleural já que a depuração pleural se faz fundamentalmente pela pleura parietal nomeadamente através dos seus vasos linfáticos.

Em 1987 foi proposto um novo modelo para a administração de drogas citostáticas (Hagiwara e Takahashi, 1987), consistindo na administração intracavitária de citostáticos adsorvidos a partículas de carbono. Com este tipo de formulações pretende-se conseguir um aumento da eficácia terapêutica e uma diminuição da toxicidade sistémica normalmente associada à administração de drogas de tipo citostático. Este duplo objectivo será atingido caso se consigam obter concentrações elevadas de citostático no local de injeção e nos gânglios linfáticos satélites onde se localizam as células neoplásicas a eliminar, sem concentrações significativas nas restantes áreas corporais.

A potencial introdução na prática terapêutica da administração intrapleural deste tipo de formulações acrescentou um novo motivo de interesse para o estudo da depuração pleural de partículas. Com efeito embora sejam numerosos os trabalhos em que se estuda a depuração de partículas presentes no espaço pleural eles limitam-se a descrever o que se passa ao nível da cavidade pleural e não aquilo que se passa entre o momento em que a partícula abandona a cavidade pleural e o momento em que aparece na circulação sanguínea. Dado que a administração intracavitária de drogas citostáticas tem por objectivo obter uma acção terapêutica precisamente neste tempo intermédio que não está estudado, este foi um dos motivos por que nos propusemos estudar a distribuição intratorácica de um marcador introduzido na cavidade pleural, procurando dessa forma estabelecer um mapa cinético do envolvimento sequencial das vários grupos ganglionares do torax na depuração pleural. Os resultados deste estudo serão apresentados e discutidos no Capítulo IV.

Trabalho anterior feito neste laboratório por Grande e colaboradores tinha evidenciado a existência de uma rede linfática muito desenvolvida ao nível da pleura visceral (Grande e col, 1983). O estudo da anatomia e da histoquímica desta rede extremamente desenvolvida e que apresenta amplas conexões com a rede linfática profunda do pulmão, e para a qual é questionável a atribuição de

uma participação significativa no processo de depuração do espaço pleural, foi também um dos objectivos das nossas investigações sendo abordado no Capítulo II.

As recentes polémicas em torno da natureza e função das manchas leitosas levaram-nos a idealizar um conjunto de experiências utilizando substâncias com diferentes potenciais imunogénicos, com vista ao estudo da natureza da resposta das manchas leitosas a estes diferentes estímulos. Os dados obtidos, apresentados e discutidos no Capítulo V, permitem-nos sustentar para as manchas leitosas da cavidade pleural uma função idêntica à do tecido linfóide, à semelhança da que é apontada para as manchas leitosas da cavidade abdominal, motivo pelo qual propusemos que estas sejam agrupados conjuntamente sob a designação de Tecido Linfóide Associado às Serosas (SALT - Serosal Associated Lymphoid Tissues) por oposição á designação OALT (Omentum Associated Lymphoid Tissues), proposta por Beelen e col. em 1991, designação esta que não engloba os "milky spots" da cavidade torácica.

Estes objectivos, sumariados na Tabela 2, integram-se nas recentes directivas saídas do "Workshop on Pleural Cell Biology in Health and Disease" e publicitados no "American Review of Respiratory Diseases" (Antony e col, 1992). De entre estas directivas são para nós particularmente importantes as que a seguir se enumeram e para as quais tentamos dar o nosso contributo.

- a) Desenvolvimento de modelos animais para estudo da fisiologia e fisiopatologia da cavidade pleural.
- b) Definição do papel do mesotélio na manutenção do meio normal do espaço pleural e sua correlação alterações patológicas.
- c) Clarificação dos mecanismos moduladores dos vários tipos de resposta imune expressa na cavidade pleural.

TABELA 2

OBJECTIVOS DO ESTUDO

- Definição das vias e da cinética da depuração de partículas a partir da cavidade pleural.
 - Investigar o papel da célula mesotelial na depuração do espaço pleural.
 - Estabelecer o papel dos linfáticos pleurais (parietais e viscerais) na depuração deste espaço.
 - Caracterizar a ultraestrutura das manchas leitosas.
 - Estudar a resposta das manchas leitosas a substâncias imunomodadoras
-

2

MORFOLOGIA DO SISTEMA LINFÁTICO DO PULMÃO

2.1

A new method for study of lung lymphatics

A. de Sousa Pereira, Nuno R. Grande

*Instituto de Ciencias Biomedicas Abel Salazar
Universidade do Porto
Largo Prof. Abel Salazar
Porto Portugal*

The study of the lung lymphatic drainage, the relationship between superficial and deep lymphatics and their segmental distribution, requires the improvement of new macroscopic and microscopical techniques.

We present a technique which allows us to study the lymphatic pathways from the subpleural plexus to the hilar ganglia with the preservation of the tridimensional structure of the lung. This technique combines both injection of contrast or plastic substances and lung mummification.

MATERIALS AND METHODS

Human traqueopulmonary blocks were collected in autopsies of human adults died from other causes than pulmonary. After washing with warm fisiologic serum made by the pulmonary veins, the superficial lymphatics were canulated with intradermic needles and barium sulphate or methyl methacrylate resin are injected, under manual pressure until the product reaches the hilar ganglia.

The traquea is then canulated as well as the great vessels of the hila and connected to a mechanic pump that delivers air at a constant pressure of 0,1 bar. The air passes across a reservoir containing a mixture of ethanol and formalin in the proportion of 9:1 before it reaches the lung (Fig.1) and is humidified by this mixture. This apparatus is maintained during 7-9 days.

OBSERVATIONS

The final result of this procedure is an anatomical mummified piece (Fig.2) with average weight of 100 gr. easy manuseable for teaching purposes as for investigation ones. This piece as a consistency like cork can be radiografated serial slices (Fig.4) or dissected under the guidance of the plastic materials injected.

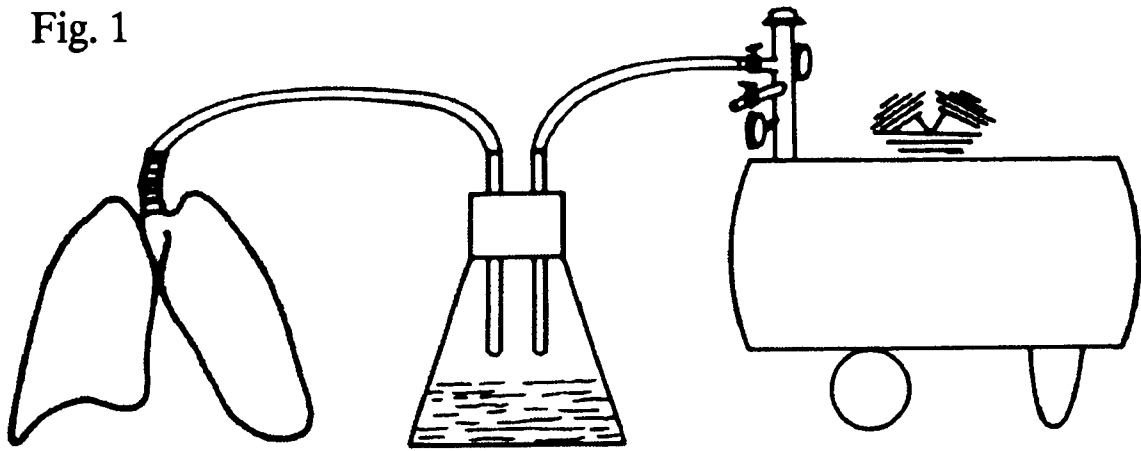
DISCUSSION

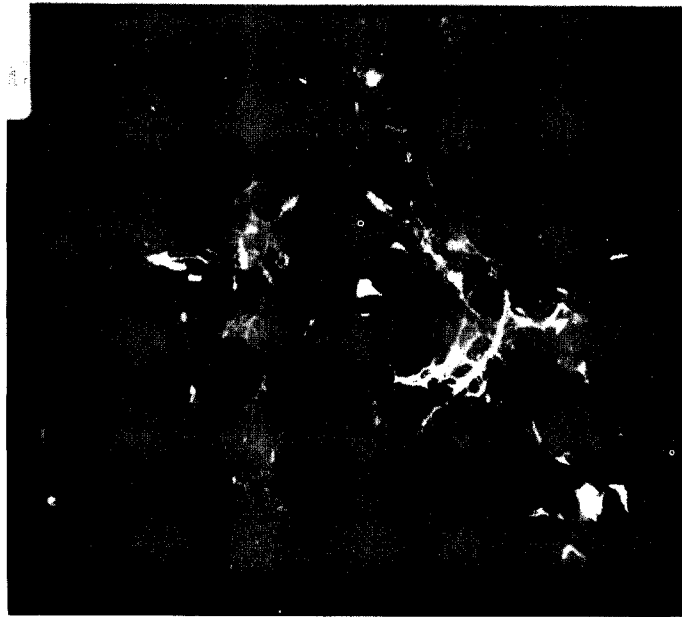
Notwithstanding the fact that the first studies on lung lymphatics were done in 1866 by Wywodzoff little evolution take place since then in the techniques used for the study of lung lymphatics in special the relations between the superficial and deep lymphatic system. The method presented permits the study of lymphatic distribution by Rx as by dissection and gives a global perspective of is anatomy. It gives also a good anatomical piece for teaching purposes because to the position of lungs in torax.

REFERENCES

- TOMPSETT, D.H.: Anatomical Techniques, E. & S. Livingstone 1970
- TRAPNELL, D.H.: The peripheral lymphatics of the lung, Brit. Radiol. 36-249.660-672

Fig. 1





2.2

Morfologia do sistema linfático do pulmão humano

O emprego da técnica de injeção-mumificação e injeção radiografia, descrito atrás, permitiu-nos um estudo detalhado da morfologia dos vasos linfáticos da rede sub-pleural do pulmão. O exame macroscópico da superfície pleural efectuado a fresco, isto é antes da injeção da peça, revelou a existência de numerosos colectores linfáticos dispersos pela superfície de todos os lobos pulmonares sendo no entanto mais numerosos nos lobos inferiores. Após a canulação e injeção destes colectores linfáticos subpleurais vasos linfáticos de menor calibre, foram revelados pelo preenchimento efectuado pelo marcador injectado. Estes vasos formam uma rede muito densa assumindo múltiplas formas (Fig. 2.1 e Fig. 2.2) e sem um padrão geométrico definido ou característico. Com origem nesta rede foram identificados vasos linfáticos delgados em forma de dedo de luva (Fig. 2.3). Este aspecto em dedo de luva provávelmente corresponde a paragens de progressão do produto de injeção devido á presença de válvulas. A rede linfática apresentava uma malha mais apertada nos lobos inferiores que nos superiores, traduzindo um maior número de vasos por unidade de área nos primeiros. As redes capilares linfáticas da pleura visceral confluem em um ou vários colectores por cada lobo pulmonar, (não sendo de excluir alguma correspondencia entre estes colectores e a segmentação pulmonar), seguindo estes colectores dois trajectos possiveis:

- i) aprofundam-se no parenquima pulmonar, estabelecendo anastomoses francas com a rede profunda do pulmão, seguindo o trajecto dos septos conjuntivos juxta-alveolares, ou;
- ii) dirigem-se directamente para o hilo do pulmão segundo um trajecto inteiramente subpleural (Fig. 2.4).

Esta última possibilidade negada por alguns autores, e apontada como preferencial por outros (Riquet, 1989) aparece com muita frequencia em particular quando se trata do lobo médio do pulmão direito. Também contrariamente ao expresso por alguns autores que

estudaram os linfáticos pulmonares não encontramos nenhum pulmão humano em que não fossem identificáveis os linfáticos da pleura visceral.

O estudo dos vasos linfáticos pulmonares utilizando a técnica de detecção histoquímica da 5'-Nucleotidase, uma enzima que aparece associada ao endotélio linfático permitiu concluir ainda que do ponto de vista da histoquímica desta enzima não há diferenças entre a rede linfática superficial e profunda do pulmão, como se verá a seguir. Ao nível dos espaços alveolares não se encontraram vasos linfáticos por qualquer dos métodos empregues, confirmando-se assim a ideia de que a presença de vasos linfáticos nesta localização tem certamente significado patológico.

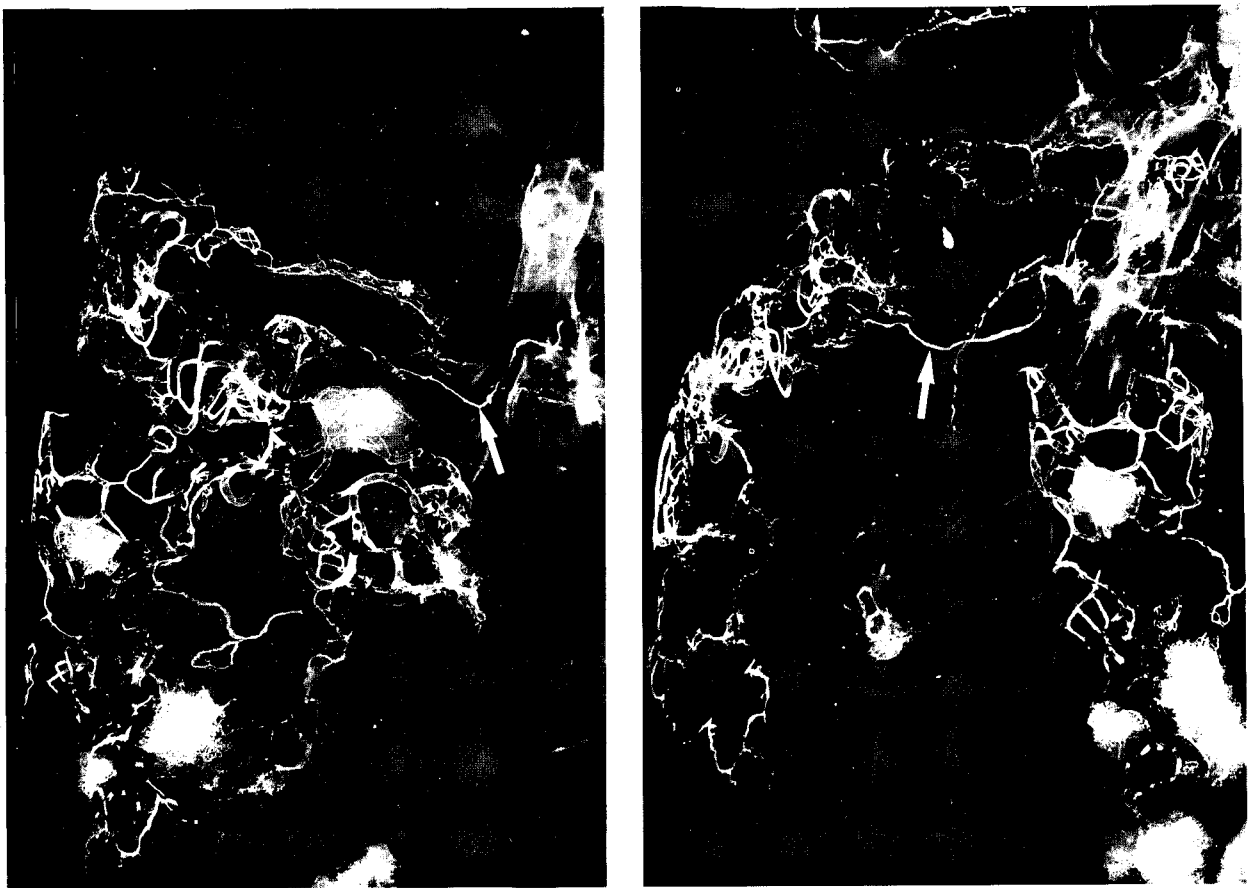


Fig. 2.2. - Imagens radiográficas da rede linfática pleural humana obtidas após injeção com sulfato de bário. São visíveis incidência frontal (a) e tangencial (b) da rede linfática subpleural. O padrão é irregular e pode-se observar a confluência de vários linfáticos num grande colector (seta) que se dirige para o hilo do pulmão.

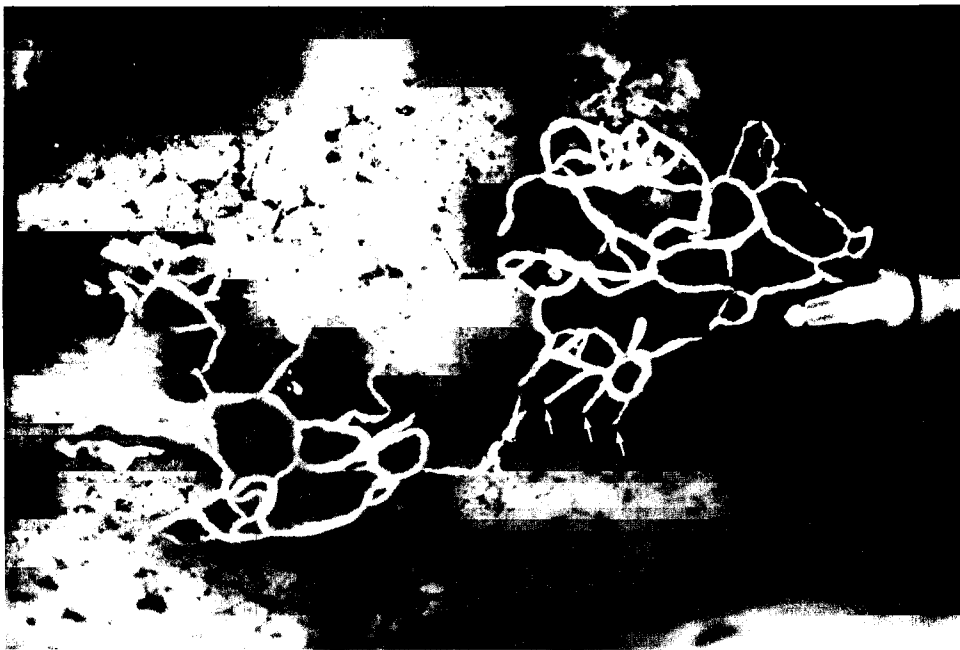


Fig. 2.3. - Após a canulação e injeção do produto destinado ao preenchimento dos capilares linfáticos vários ramos em dedo de luva são revelados como se ilustra nesta imagem (setas). Tal poderá corresponder a válvulas linfáticas.



Fig. 2.4. - Imagem ilustrando a confluência de vários linfáticos num colector que se dirige para o hilo do pulmão seguindo um trajecto subpleural, neste caso na face intercisural do pulmão (seta).

2.3

ENZYME-HISTOCHEMICAL STUDY OF LYMPHATIC CAPILLARIES IN LUNG PARENCHYMA

**A. de Sousa Pereira¹, Mário N. Peão² and Nuno R.
Grande¹**

1 - Normal Morphology Unit, Abel Salazar Institute for Biomedical
Sciences, University of Porto

2 - Department of Morphological Sciences of the Medicine Faculty,
University Agostinho Neto, Luanda, Angola

Address for correspondence:

Nuno Rodrigues Grande, M.D., Ph.D.
Professor and Chairman,
Department of Anatomy
Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences
Largo Prof. Abel Salazar, 2
4000 PORTO, PORTUGAL
Fax: 351-2-2001918 or 351-2-699157

Key Words: Lung, Lymphatics, 5'-Nucleotidase, Histochemistry

ABSTRACT

We have visualized the lung lymphatics using the 5'-nucleotidase (5'-Nase) histochemical staining method. The specificity of the 5'-Nase reaction was controlled through the inhibition of nonspecific alkaline phosphatase (ALPase) by including L-Tetramisole in the substractum incubating medium. The 5'-Nase method allowed us to identify the lymphatics of the superficial subpleural network as well as the lymphatic vessels associated with the deep lung tissue. Intense reaction products of 5'-Nase activity were deposited in the endothelial cells of the wall of the lymphatic vessels and in the endothelial cells at the valves. The blood vessels of the lung did not show any positive reaction for the 5'-Nase. Thus, 5'-Nase detection is an excellent method to study the microanatomy of lung lymphatics and it has some advantage when compared with other methods proposed, to differentiate lymphatic vessels from blood vessels, like the immunohistochemical detection of the presence of laminin and the toluidine blue staining of the lumen of lymph vessels.

Our data showed that: (1) the alveolar region of the lung is devoid of lymphatic capillaries; (2) the superficial and deep networks of lung lymphatics presented similar histochemical reactivity to the 5'-Nase method.

INTRODUCTION

Lymphatic invasion is an important prognosis factor in malignant disease of the lung system. The distinction between small venules and lymphatic capillaries, and between smaller veins and lymphatic collecting vessels is, however, difficult or impossible to make by light microscopy. Several methods have been recently developed to facilitate the distinction between these two different types of vascular structures by light microscopy, namely histochemical (1) and immunohistochemical ones (2,3).

Here, we decided to investigate the topography of lung lymphatics using the 5'-Nase histochemical method as it was described by Werner, Schunke and Tillmann in 1987. This is a pertinent endeavour since the fine distribution of lymphatics at the alveolar level is still controversial, namely in pathological conditions such as mitral stenosis and pulmonary hypertension. In these situations, some authors have reported that lymphatic capillaries appear at the alveolar wall (4,5,6).

Our data on the arrangement of pleuropulmonary lymphatics as viewed by the 5'-Nase staining documented that the alveolar wall does not contain lymphatic capillaries. These vessels form well-developed plexus around the air conducting channels.

MATERIALS AND METHODS

The lungs of ether-anesthetised Wistar rats of both sexes weighing from 150 to 200 g were fixed by perfusion via the pulmonary artery with cold formaldehyde-CaCl₂ fixative (6% paraformaldehyde, 1% CaCl₂) in 0,1M cacodylate buffer (7% sucrose).

The lungs were excised and immediately frozen in liquid nitrogen. Sections (15-18 µm thick) were cut in a cryostat and mounted on gelatin coated slides. The sections were then immersed in the same fixative for 10 min. After washing in cacodylate buffer they were incubated for 30-60 min. in a lead based standard medium for 5'-nucleotidase reaction according to the method of Wachstein and Meisel (7) for light microscopy, as reported previously (8,9). The standard medium contains: 20 ml 0,2M Tris-maleate buffer (pH 7.2); 25 mg 5'- adenosine monophosphate (AMP, sodium salt, A-1752 Sigma); 5 ml 0.1 M Mg SO₄; 3 g sucrose; 22 ml distilled water; and 3 ml Pb (NO₃)₂ 2% (Taab). To control the specificity of the reaction for 5'-Nucleotidase activity, 10 mg of L-Tetramisole (L-Tetramisole, T-1512 Sigma), an inhibitor of nonspecific alkaline phosphatase, was added to the standard medium according to the method of Werner, Schunke and Tillman (1). Following incubation in the medium, the sections were briefly washed in distilled water, treated with dilute ammonium sulphide during 2 minutes, and mounted in glycerin for light microscopy.

RESULTS

In cryostat sections incubated in the standard medium for 5'-nucleotidase (5'-Nase) reaction, the dark brown lead sulfide reaction product was detected in the walls of lymphatic vessels of the lung whereas little or no activity was seen in blood capillaries. The lymphatic vessels were located in two distinct domains of the lung tissue: i) just underneath the leaflet of the visceral pleura, in the subpleural connective tissue (Fig. 1 and 2); ii) inside the lung parenchyma (fig. 3) around the bronchial and vascular tree. 5'-Nase activity in the alveolar region was completely absent. Figure 1 shows the distribution of 5'-Nase-positive lymphatics in the subpleural connective tissue. Blood vessels, the main component of the alveolar wall, show no reaction. Figure 2A illustrates the well developed, strongly positive, lymphatic capillary plexus, located in a juxta-hylar position. Lymphatic vessels with valves are seen in the figure 2B demonstrating that no differences exist between the reaction of the lymphatic wall and the valve. The lymphatics surrounding the bronchial wall were also strongly stained by 5'-Nase methodology as it can be seen in figure 3 showing a well developed lymphatic collecting vessel located in the adventitia of a bronchus. Figure 4 illustrates the aspect of the deep lung parenchyma with almost complete absence of 5'-Nase reaction product, thus documenting that at the alveolar level there are no lymphatic vessels.

DISCUSSION

Since the lung is supplied by an extensive microvascular bed which produces a constant filtration of fluid and macromolecules, it can be expected that the lymphatic capillaries inside lung parenchyma form a well developed maze. Nevertheless the alveolar wall is considered to be poor in lymphatic capillaries (10,11,12). In fact, current views see the pulmonary lymphatic drainage system as consisting in two distinct components: i) a well developed superficial subpleural network and ii) a deep or intrapulmonary network located around the bronchial and vascular tree of the lung as well as in the interlobular septum (13). However, in pathologic conditions such as mitral stenosis (4) and pulmonary hypertension (5,6) lymphatic vessels have been observed in the alveolar wall. Because these vessels are difficult to identify, in particular the smallest of them, lymphatic capillaries are sometimes interpreted as artifactual tissue spaces. Even with the electron microscope, it is difficult to distinguish between mesenchymal cells and primitive endothelial cells of lymphatics or of the microvasculature (14). To help in the distinction between blood and lymphatic vessels several methods have been developed, namely the detection of the activity of 5'-Nase, an enzyme which is associated with the plasma membrane of lymphatic endothelial cells and catalyzes the diphosphorilation of 5'-Nucleotide monophosphates. When L-Tetramisole is added to the standard incubation medium of Wachstein and Meisel (7) to obtain an inhibition of the nonspecific ALPase (1), a selective identification

of lymphatic vessels is obtained because 5'-Nase shows much higher activity in the wall of lymphatics than in that of blood vessels.

Although the 5'-Nase method was used before with good results in various mammalian tissues this is the first study that reports on its application to the study of lung lymphatics. As shown before in the posterior pharyngeal surface (1) and other organs like the stomach (15), small intestine (8) and thymus (9) we have also found here the great selectivity and specificity of the 5'-Nase reaction in the identification of lymphatic vessels of the lung system. In fact, it was possible to identify correctly the different components of the lymphatic system of the lung, i.e., the subpleural network and the deep network. We have not observed differences in the 5'-Nase reactivity of these two components of the lung lymphatic system.

In the alveolar wall we did not find any lymphatic vessels. The lack of immediate lymphatic drainage of the alveolar wall may be the structural rationale for the slow rate of migration of particle-containing macrophages from alveoli up to regional lymph nodes (16,17) when compared with the more rapid sorting of particle-laden macrophages from the pleural space (18).

The herein documented ability of the 5'-Nase method to identify the lung lymphatics, indicates that this technique is a helpful strategy to be applied in surgical pathology of the lung and also in the study of lymphatic changes associated with pathologic conditions other than surgical.

Other methods, namely immunohistochemical ones have been proposed to distinguish between lymphatic and blood vessels based in the detection of

laminin (2,3). This method identifies the lymphatic vessels by the absence of laminin, in contrast with blood vessels, that react positively. Comparatively with this latter method the detection of the 5'-Nase activity shows several advantages. For instance the laminin immunohistochemistry does not allow a positive identification of lymphatic vessels in the tissues, thus, some of the lymphatics interpreted as such by the lack of laminin staining may actually correspond to artifactual spaces.

Another method proposed to identify lymphatic vessels is the toluidine blue staining to be used only after arterial perfusion-fixation (3). This method allows the detection of lymphatic capillaries because of the blue staining of their protein containing lumen. In the lung, however, we believe that the toluidine method is of little help because of the natural retractability of the lung tissue which causes absence of open lumens, particularly in the smallest lymphatic vessels.

In conclusion, we propose that the 5'-Nase method is an elective histochemical technique to visualize the lymphatics of the lung because it is well adapted to the peculiarities of the microanatomical organisation of the organ.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Artur Águas for his collaboration in the text revision and permanent constructive advice. The technical assistance of A. Ribeiro, Costa e Silva and J. Aurélio Pereira is gratefully acknowledged.

References

- 1 - Werner, JA, M Schunke, B Tillmann: Histochemical visualisation of lymphatic capillaries in the rat: A comparison of methods demonstrated at the posterior pharyngeal surface. *Arch. Histol. Jap.* 50-5 (1987) 505
- 2 - Hultberg, BM, H Svanholm: Immunohistochemical differentiation between lymphangiographically verified lymphatic vessels and blood vessels. *Virchows Archiv A. Pathol. Anat.* 414 (1989) 209
- 3 - Kubo H, Y Otsuki, S Magari, O Sugimoto: Comparative study of lymphatics and blood vessels. *Acta Histochem. Cytochem.* 23-5 (1990) 621
- 4 - D'Arrigo, S: I vasi linfatici nel polmone mitralico. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 35 (1959) 1536
- 5 - Grande NR: Pulmonary arterial hypertension. PhD Thesis. University of Porto 1965
- 6 - Barroso-Moguel: Los vasos linfáticos pulmonares en enfermos con hipertension del circuito menor. *Gac. Med. Mexico* 89 (1959) 525
- 7 - Wachstein, M, E Meisel: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. *Amer. J. Clin. Pathol.* 130 (1957) 153
- 8 - Kato, S, A Yasunaga, Y Uchida: Enzyme-histochemical method for identification of lymphatic capillaries. *Lymphology* 24(1991) 125
- 9 - Kato, S: Enzyme-histochemical demonstration of intralobular lymphatic vessels in the mouse thymus. *Arch. Histol. Cytol.* 53S (1990) 87

- 10 - Grande, NR, O Yeep, E Carvalho, C Sá: Alveolar septal changes in pulmonary edema. A subcellular study of lung clearance in the dog. *J. Submicrosc. Cytol.* 19 (1987), 43.
- 11 - Lauweryns, JM: The juxta-alveolar lymphatics in the human adult lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115 (1977) 625
- 12 - Tobin, CE: Human pulmonic lymphatics. *Anat. Rec.* 127 (1957) 611
- 13 - Grande, NR, AS Pereira, MND Peão, AP Águas: Embriological and structural basis of respiratory function. In: *Clinical Pneumology*, Vol. I, Freitas e Costa Ed., Lisbon Medical School Press, Lisbon (1992)
- 14 - Schmid-Schonbein, GW: Microlymphatics and lymph flow. *Physiological Reviews* 70-4 (1990) 987
- 15 - Kato, S: Enzyme-histochemical identification of lymphatic vessels by light and backscattered image scanning electron microscopy. *Stain Technology* 65 (3,1990) 131
- 16 - Grande, NR, C Moreira de Sá, AP Águas, E Carvalho, M Soares: Time course and distribution of tungsten laden macrophages in the hilar lymph nodes of the dog lung after experimental instillation of calcium tungstate into the left apical bronchus. *Lymphology* 23 (1990), 171
- 17 - Águas, AP, NR Grande, E Carvalho: Inflammatory macrophages in the dog contain high amounts of intravesicular ferritin and are associated with pouches of connective fibers. *Am. J. Anat.* 190 (1991), 89

18 - Pereira, AS, NR Grande: Experimental study on particle clearance from the pleural space into the thoracic lymph nodes. *Lymphology* (1992)*in press*

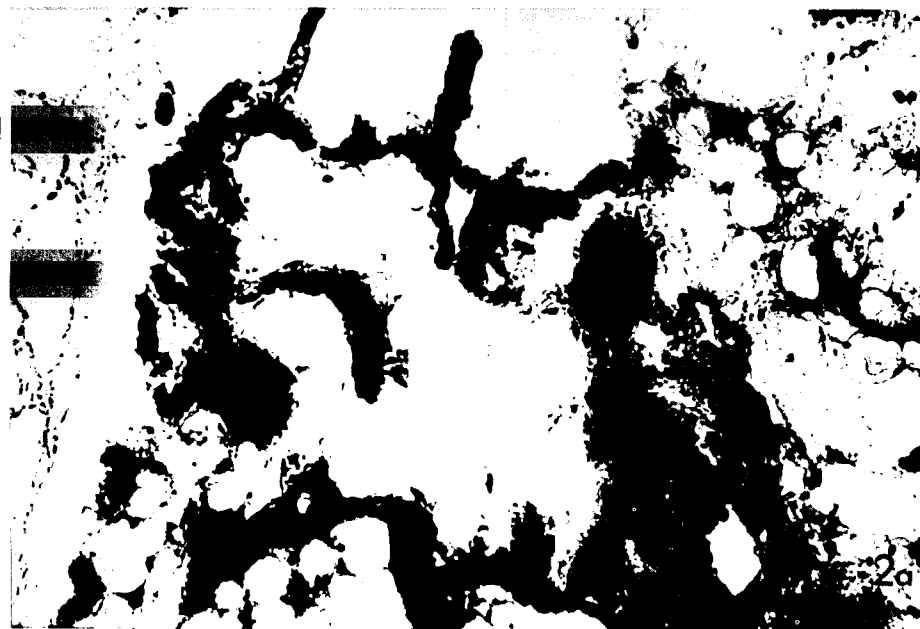
LEGENDS OF THE FIGURES

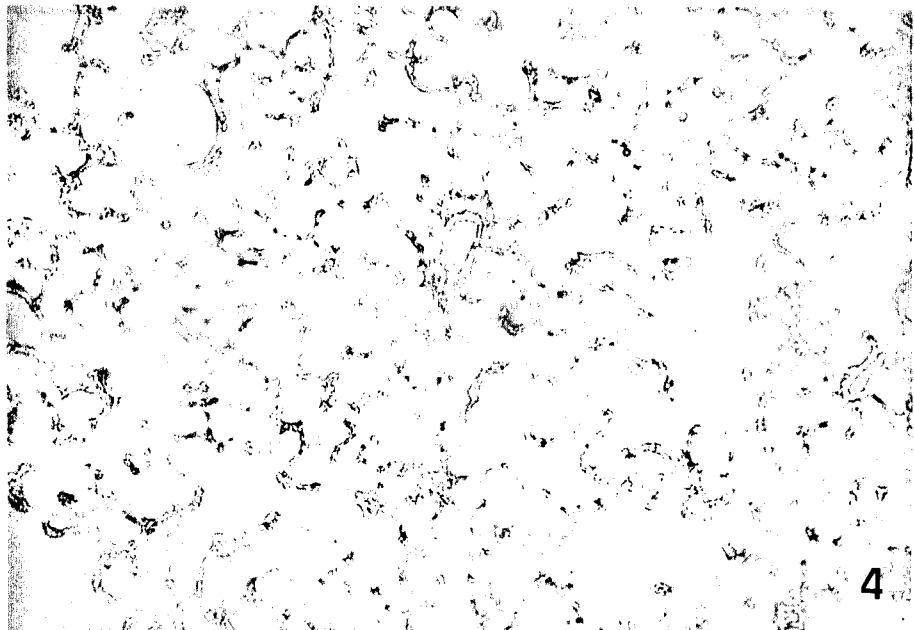
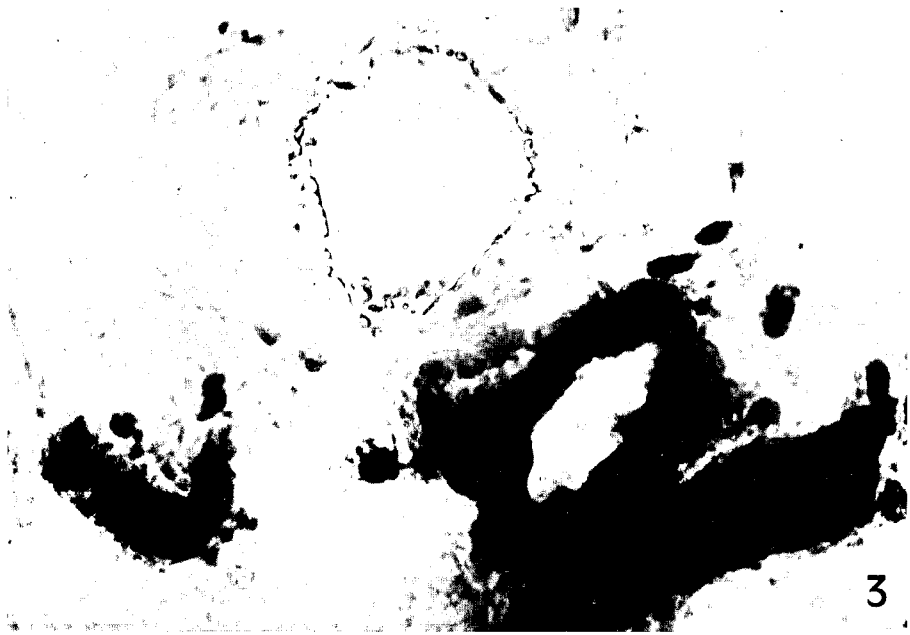
Figure 1. Light micrograph of a section of the periphery of the lung tissue, showing the visceral leaflet of the pleura with histochemical demonstration of lymphatic capillaries revealed by the abundant deposits of the 5'-Nase reaction product. The figure document the richness of the subpleural connective tissue in lymphatic vessels.

Figure 2. Light micrographs of the hilar region of the lung showing a well developed network of lymphatic vessels. Figure 2B shows a valve with strong activity for 5'-Nase. This suggests that there are no differences in reativity between the endothelial cells lining the vessel wall and of ones making up the valve.

Figure 3. Light micrograph illustrating small collecting lymphatic vessels located in the adventicia of a bronchial structure.

Figure 4. Light micrograph showing absence of 5'-Nase reaction product at the alveolli of the lung thus indicating that the deep region of the normal lung parenchyma is deprived of lymphatic vessels





3

**PAPEL DA CÉLULA MESOTELIAL
VISCERAL NA DEPURAÇÃO
DO ESPAÇO PLEURAL**

A. de Sousa Pereira
N.R. Grande
E. Carvalho
A. Ribeiro

Department of Anatomy, Abel Salazar
Institute for the Biomedical Sciences,
University of Porto, Portugal

Evidence of Drainage of Tungsten Particles Introduced in the Pleural Space through the Visceral Pleura into the Lung Parenchyma

Key Words

Pleura
Pleural space
Pleural clearance
Mesothelial cell
Macrophages
Calcium tungstate particles

Abstract

Studies of pleural clearance of calcium tungstate particles were made in the dog. By using scanning electron microscopy and elemental microanalysis, we show that mesothelial cells of the visceral leaflet of the pleura are also involved in the clearance of particles present in the pleural space. The histological study of lung parenchyma shows many macrophages loaded with tungsten particles, and we conclude that this way may be an important pathway for the transmission of pathologic processes from the pleural space to the lung.

Introduction

The absorbing capacities of mesothelial cells in general have been the subject of numerous studies aiming at understanding the evolution of liquid effusions inside cavities lined by this type of epithelia. Another purpose of this type of studies is the understanding of the dissemination of neoplastic or infectious processes from these spaces. In particular as regards the pleural space, there are numerous studies, and almost all the results consider the two leaflets of the pleura as having different absorbing capacities, which is also reflected in the morphology of its cells when observed by electron microscopy [1-3]. Nevertheless, many points remain unknown or controversial and deserve further investigation [4].

In the present work we reinvestigate the absorbing capacities of the visceral mesothelial cell of the pleura, and we conclude that this cell is also capable of absorbing particles

from the pleural space. Our data suggest that pathologic processes of the pleural space could pass to the lung parenchyma through the visceral pleura.

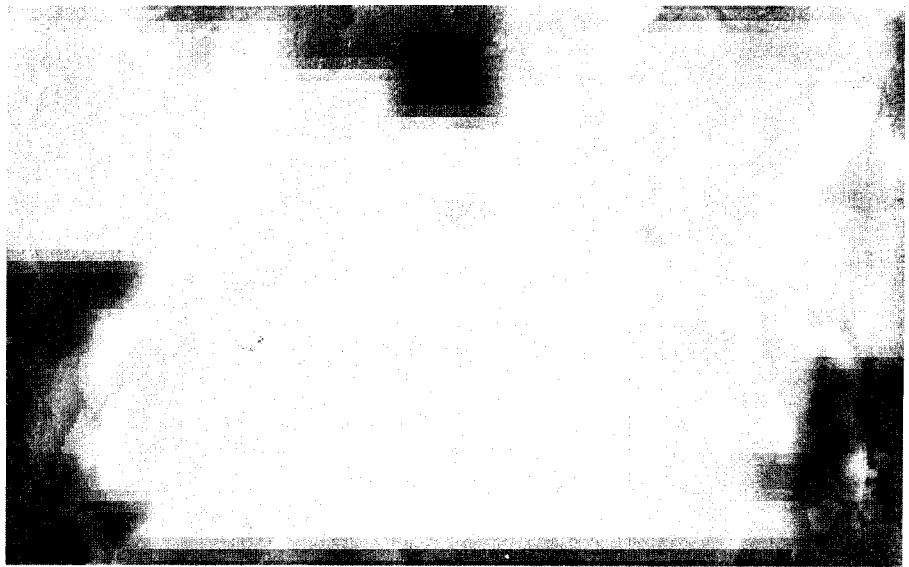
Materials and Methods

Animals

Four adult mongrel dogs of both sexes were used. The dogs were housed individually in kennels, fed standard dog food and had unrestrained access to water. Food and water were withheld overnight before anesthesia.

Experimental Protocol

Dogs were anesthetized by intravenous injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg of body weight), and the right pleural space was surgically exposed by thoracotomy performed at the level of the fourth intercostal space. Two milliliters of physiological saline with 2 g of calcium tungstate (CaWO_4 ; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisc., USA) were then introduced into the pleural space. We chose CaWO_4

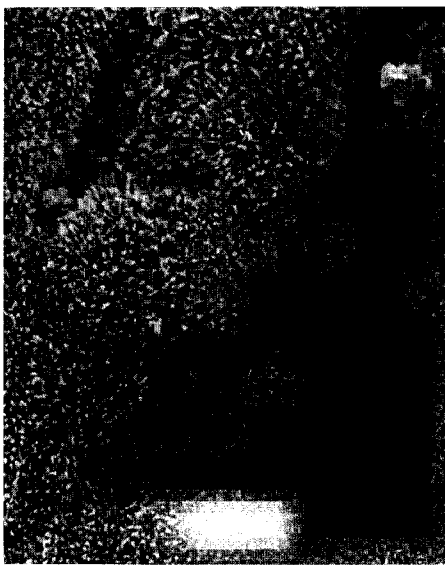


a



b

Fig. 1. **a** Scanning electron micrographs of parietal pleura 3 days after instillation of tungsten particles in the pleural space. **b** The elemental analysis picks up numerous tungsten-positive cells. $\times 26,250$.



a



b

Fig. 2. High-magnification scanning electron micrographs of the visceral pleura 3 days after tungsten instillation in the pleural space. **a** Routine SEM mode. **b** Tungsten detection by elemental analysis. By comparing the two images, it can be concluded that tungsten is located intracellularly in a mesothelial cell. $\times 79,200$.

as the particle marker because of three advantageous features: (1) it is a water-insoluble, nonantigenic particle of an exceedingly rare component of the normal breathing atmosphere; (2) it is made up of small tetragonal crystals (less than 10 μm in length) readily identifiable by light microscopy because of its autofluorescence and refringency (expressed by a yellow-green color); (3) it can be specifically identified in scanning electron-microscopic preparations upon elemental detection of tungsten [5].

The dogs were divided into two groups of two dogs each that were sacrificed 3 days after the surgical procedure. The second group (control group) was submitted to identical surgery, but no CaWO_4 was introduced into the pleural space. All dogs were sacrificed by intravenous injection of a lethal dose of sodium pentobarbital followed by exsanguination. Samples of the following structures were collected: parietal pleura, visceral pleura and lung tissue. The samples were processed for (1) light microscopy and (2) scanning electron microscopy.

Light Microscopy

The samples were formalin-fixed and paraffin-embedded, and the sections were stained by the hematoxylin-eosin method.

Scanning Electron Microscopy

The samples were fixed for 24 h at room temperature in an aldehyde mixture made up of 4% formaldehyde, 1.25% glutaraldehyde, and 10 mM CaCl_2 in 0.05 M cacodylate buffer. The specimens were washed in buffer, dehydrated in ethanols and critical point dried in a Balzers apparatus using carbon dioxide as the transitional fluid. The preparations were coated by Au/Pt under vacuum and examined in a Jeol JSM-35C scanning electron microscope. The electron micrographs were derived from secondary or retrodiffused electrons. This latter method was used to detect tungsten in situ by elemental analysis of the tissue preparations.

Results

The presence of tungsten-positive mesothelial cells in the different portions of the pleural leaflet was studied by scanning electron microscopy using elemental particle analysis to specifically identify tungsten (tungsten deposits appear as white spots in scanning electron micrographs). Three days after tungsten injection into the pleural space, numerous mesothelial cells were loaded with particles of the tungsten salt (fig. 1a, b). In the areas of the surface of the parietal pleura where heavy deposition of tungsten in the mesothelial cells was found, a heterogeneous extracellular layer was also observed, consisting in cellular debris, erythrocytes and tungsten held together by a mucous substance.

On day 3, tungsten-positive mesothelial cells were also detected in the visceral pleura (fig. 2a, b) although in smaller numbers than in the parietal pleura. High-magnification views of tungsten-positive areas of the pleural membrane showed that the inclusions were located intracellularly. The light microscopy examination of lung tissue

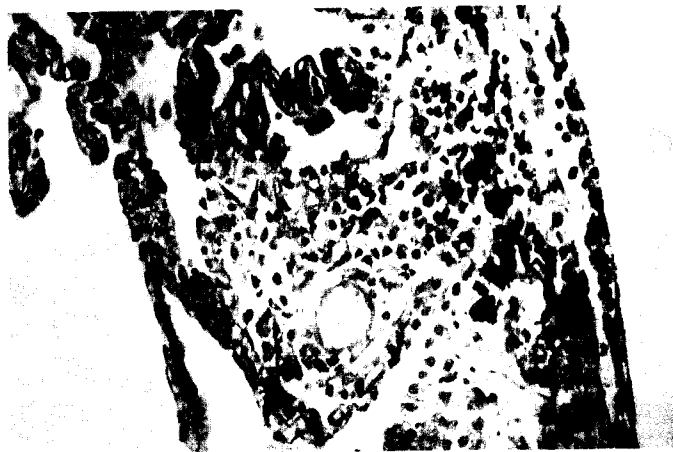


Fig. 3. Light microscopy micrograph of lung beneath the visceral pleura. A high density of tungsten inclusions (black spots) is seen in the subpleural connective tissue. $\times 1,575$.

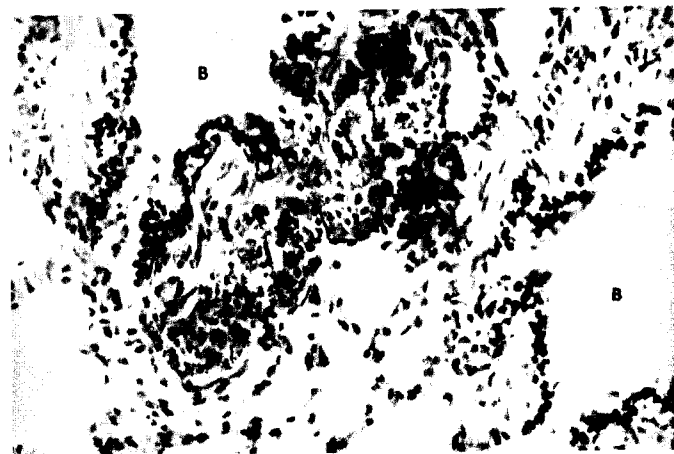


Fig. 4. Micrograph of an aggregate of macrophages and lymphoid cells found deeply in the lung between two bronchioles (B). A high density of small-sized tungsten deposits is observed inside macrophages. $\times 1,575$.

samples collected also on day 3 showed abundant particles of tungsten in the subpleural space always inside macrophages (fig. 3) and also in the bronchoalveolar lymphoid tissue found inside the lung tissue (fig. 4).

Discussion

Current views on the clearance of particles introduced into the pleural space consider that this is a rapid process and that the particles translocate from the pleural space via

the parietal pleura [2, 6-12]. In fact, according to Kanazawa [8], the absorption of fairly large particles from the pleural cavity takes place by three different pathways: (1) stomata in the pleura, (2) crevices in the mediastinal pleura and (3) milky spots. All these structures are located in the parietal pleura [9, 13-16]. The visceral pleura, in contrast, is considered by several authors to be unable to absorb particles from the pleural space [6, 8, 9, 17-19].

In this study, we reinvestigated the pathways used by particles to leave the pleural space of dogs. We found that these particles were ingested by mesothelial cells of both the parietal and visceral pleura. These findings are therefore in contrast with previous studies claiming that only the parietal leaflet of the pleura has the capability to absorb particles from the pleural space. In addition, tungsten-laden macrophages were also detected in subpleural connective tissue and the lung. This demonstrates that the particles can penetrate the lung tissue through the visceral pleura. It can be concluded that pathologic particles present in the pleural space can pass through the visceral pleura to the lung parenchyma. The fact that tungsten particles in the subpleural connective tissue are virtually all located

inside macrophages deserves further investigation to understand the translocation of tungsten particles from mesothelial cells to macrophages.

In conclusion, this study documents that particles present in the pleural space can be ingested by mesothelial cells of the visceral pleura and, more importantly, can later be found among the parenchyma of the lung. The phenomenon may have crucial physiological and pathologic consequences for the lung. Conceivably it can now be assumed that exogenous or infectious particles present in the pleural space may disseminate into the lung parenchyma through the visceral pleura.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Artur Águas for suggestions throughout the course of this study and for critical evaluation of the manuscript. We thank Mr. Costa e Silva and Mrs. Vanda Silva for technical help, and Mr. Jose Aurelio and Mr. Duarte Monteiro for photographic work. We acknowledge the surgical help of the Service of Experimental Surgery. This investigation was supported by grants from the Portuguese Research Council (JNICT).

References

- 1 Jaurand MC, Bernaudin JF, Bignon J: La cellule mésothéliale. *Rev Prat (Paris)* 1990; 40:1823-1828.
- 2 Wang NS: The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1974;10:623-633.
- 3 Baradi AF, Hope J: Observations on ultrastructure of rabbit mesothelium. *Exp Cell Res* 1964;34:33-44.
- 4 Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C: Pleural liquid and solute exchange. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:825-847.
- 5 Grande NR, Sá CM, Águas AP, Carvalho E, Soares M: Time course and distribution of tungsten-laden macrophages in the hilar lymph nodes of the dog lung after experimental instillation of calcium tungstate into the left apical bronchus. *Lymphology* 1990;23:171-182.
- 6 Astoul P, Boutin C, Seitz B: Diagnostic des pleurésies. *Rev Prat (Paris)* 1990;40:1829-1836.
- 7 Kotani M: The lymphatics and lymphoreticular tissues in relation to the action of sex hormones. *Arch Histol Cytol* 1990;53:1-76.
- 8 Kanazawa K: Exchanges through the pleura: Cells and particles; in Chrétien J, Bignon J, Hirsch A (eds): *The Pleura in Health and Disease*. New York: Dekker, 1985, pp 195-231.
- 9 Wang NS: The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 1975;111:12-20.
- 10 Wang NS: Anatomy and physiology of the pleural space. *Clin Chest Med* 1985;6:3-18.
- 11 Burke HE: The lymphatics which drain the potential space between the visceral and the parietal pleura. *Am Rev Tuberc* 1959;79:52-69.
- 12 Stewart PB, Burgen ASV: The turnover of fluid in the dog's pleural cavity. *J Lab Clin Med* 1958;52:213-230.
- 13 Kanazawa K, Roe FJC, Yamamoto T: Milky spots (taches laiteuses) as structures which trap asbestos in mesothelial layers and their significance in the pathogenesis of mesothelial neoplasia. *Int J Cancer* 1979;23:858-865.
- 14 Remmele W, Richter IE, Wildenhof H: Experimentelle rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Resorption von Zellen aus dem Bauchraum. *Klin Wochenschr* 1975; 53:913-922.
- 15 Cooray GH: Defensive mechanisms in the mediastinum with special reference to the mechanics of pleural absorption. *J Pathol Bacteriol* 1949;61:551-567.
- 16 Kampmeier OF: Concerning certain mesothelial thickenings and vascular plexuses of the mediastinal pleura, associated with histiocyte and fat cell production, in the human newborn. *Anat Rec* 1928;39:201-208.
- 17 Hayek VH: *The Visceral Pleura in the Human Lung*. New York: Hafner, 1960.
- 18 Courtice FC, Simmonds WJ: Physiological significance of lymph drainage of the serous cavities and lungs. *Physiol Rev* 1954;34:419-448.
- 19 Courtice FC, Morris B: The effect of diaphragmatic movement on the absorption of protein and of red cells from the pleural cavity. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1953;31:227-238.

4

**PAPEL DOS VÁRIOS GRUPOS
GANGLIONARES TORÁDICOS
NA DEPURAÇÃO DO ESPAÇO
P L E U R A L**

PARTICLE CLEARANCE FROM THE CANINE PLEURAL SPACE INTO THORACIC LYMPH NODES: An Experimental Study

A.S. Pereira, N.R. Grande

Normal Morphology Unit, Abel Salazar Biomedical Science Institute, University of Oporto, Portugal

ABSTRACT

We instilled tungsten powder (CaWO_4) into the pleural space of the dog and studied the kinetics and distribution of particle translocation from the pleural space to the thoracic lymph nodes over 1-7 days. We found that the transport of tungsten particles to regional lymph nodes was present at day 1, and reached its peak at day 3. In situ detection of tungsten by elemental particle analysis of lymph node sections by scanning electron microscopy complemented by light microscopy and X-ray analysis allowed precise mapping of the marker in the thoracic nodes. The first lymph nodes to become tungsten-laden was the parasternal group (day 1-3). From day 3 to 7 tungsten inclusions decreased in these parasternal nodes while moderately increasing in the remaining intrathoracic lymph nodes. Retrocardiac pleural folds containing numerous "milky spots" also accumulated prominent amounts of tungsten early after intrapleural injection of CaWO_4 .

These data indicate that 1) particle translocation from the pleural space to regional lymph nodes is a rapid process and is first directed to the parasternal lymph nodal subgroup; 2) particle dissemination to virtually all other lymph nodes within the thorax follows thereafter; 3) retrocardiac pleural folds contribute to the clearance of particles from the pleural space.

Many respiratory disorders involve the pleural space. This serous cavity is often infiltrated by exogenous particles, infectious agents, tumor cells and also undergoes pathologic changes with a multitude of systemic diseases (1). Current structural and physiological information envisages the pleura as having important immunologic as well as biomechanical functions. A number of recent experimental studies examining the clearance capability of the pleural space have been directed primarily to fluid and electrolyte transport as opposed to particle removal (2,3). Although several studies have previously described the anatomical pathways of drainage of the pleural space (4-7), a complete understanding of the absorption-kinetics of the pleural space is still lacking. Insight into these drainage pathways is particularly relevant in light of proposed strategies of coupling administration of cytostatic drugs with particles via the pleural space (8). Accordingly, we examined the absorption of a particulate (calcium tungstate powder or CaWO_4) from the canine pleural space using several anatomical methods and were able to characterize the kinetics of the arrival of CaWO_4 to the different subgroups of intrathoracic lymph nodes. We also noted the importance of retrocardiac pleural folds in clearing tungsten from the pleural space. Finally, we compared the findings with an earlier study from our laboratory in which

CaWO₄ clearance from the bronchoalveolar space was examined (9).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Fourteen male and female adult mongrel dogs were used. The dogs were housed individually in kennels, fed standard dog food, and had unrestrained access to water. Food and water were withheld overnight before anesthesia.

Experimental protocol

Dogs were anesthetized by intravenous injection of sodium pentobarbital (40mg/kg BW). Access to the right pleural space was obtained via a thoracotomy between the fourth and fifth ribs. The parietal pleura was punctured with a rubber catheter for instillation of 5g of calcium tungstate (CaWO₄; Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI USA) in 10ml saline into the pleural space. Care was taken that no injury to the visceral pleura occurred.

The dogs were divided into five groups of two dogs each that were sacrificed 1,2,3,5 and 7 days after CaWO₄ instillation into the pleural space. Two additional groups of two dogs each were used to control the cytological and radiological appearance of the tungsten-particulate. The dogs of the first control group were untreated; the dogs of the second control group were sham-operated; no CaWO₄ was instilled and they were sacrificed 7 days after surgery. All dogs were sacrificed by a lethal intravenous injection of sodium pentobarbital after radiography of the thorax. Samples of the following intrathoracic lymph nodes were collected: left and right parasternal; left and right lung hilum; left and right para-aortic; large medial lymph node (located just beneath the carina). Left and right retrocardiac pleural folds were also sampled. Each specimen was processed for 1) x-ray analysis; 2) light microscopy; 3) scanning electron microscopy.

X-ray analysis

Immediately before dog sacrifice, plain X-ray films of the thorax were obtained using a Philips Politome machine with a voltage of 50Kv and automatic focusing. After sacrifice, high resolution radiography of different thoracic structures, including lymph nodes, pleural folds, lung, and diaphragm was performed using a Siemens Mammograph in the automatic mode. The photographic film was that regularly used to examine the human breast for microcalcifications. Nodal and pleural samples were also obtained for eight microscopy analysis and SEM.

Light microscopy

Whole lymph nodes were fixed *in toto* in formaldehyde and embedded in paraffin. Serial sections, 5µm thick were stained with hematoxylin and eosin and examined in a Zeiss Axioplan microscope. We used a semiquantitative method to compare the amount of tungsten inclusions among lymph nodal groups. The following criteria were used based on examination of 100 microscopic fields (magnification x600) chosen at random in each slide sample.

Grade 0 - No tungsten particle seen.

Grade + - Tungsten found in 1 out of 10 microscopic fields.

Grade ++ - Tungsten found in 8-9 out of 10 microscopic fields.

Grade +++ - Tungsten found in all microscopic fields.

Grade ++++ - Tungsten found both in all microscopic fields along with multiple inclusions in each tungsten positive cell.

Scanning electron microscopy

Aldehyde fixed and washed nodal and pleural samples were dehydrated in ethanol and critical-point-dried in a Balzers apparatus using carbon dioxide as the transitional fluid. The preparations were



Fig. 1. Lateral X-ray of the thorax obtained 3 days after the injection of CaWO_4 into the pleural space. The appearance of the tungsten marker is highly distinctive and has accumulated in areas corresponding to the paravertebral costal sinus (A), parasternal lymph nodes (B) and retrocardiac mediastinal pleural folds (C). Ca=caudal; Cr=cranial.

coated by Au/Pt under vacuum and examined in a JEOL JSM-35C scanning electron microscope. The electron micrographs were derived from secondary or backscattered electrons, the latter mode being used to detect tungsten *in situ* by elemental particle analysis of the tissue preparations.

RESULTS

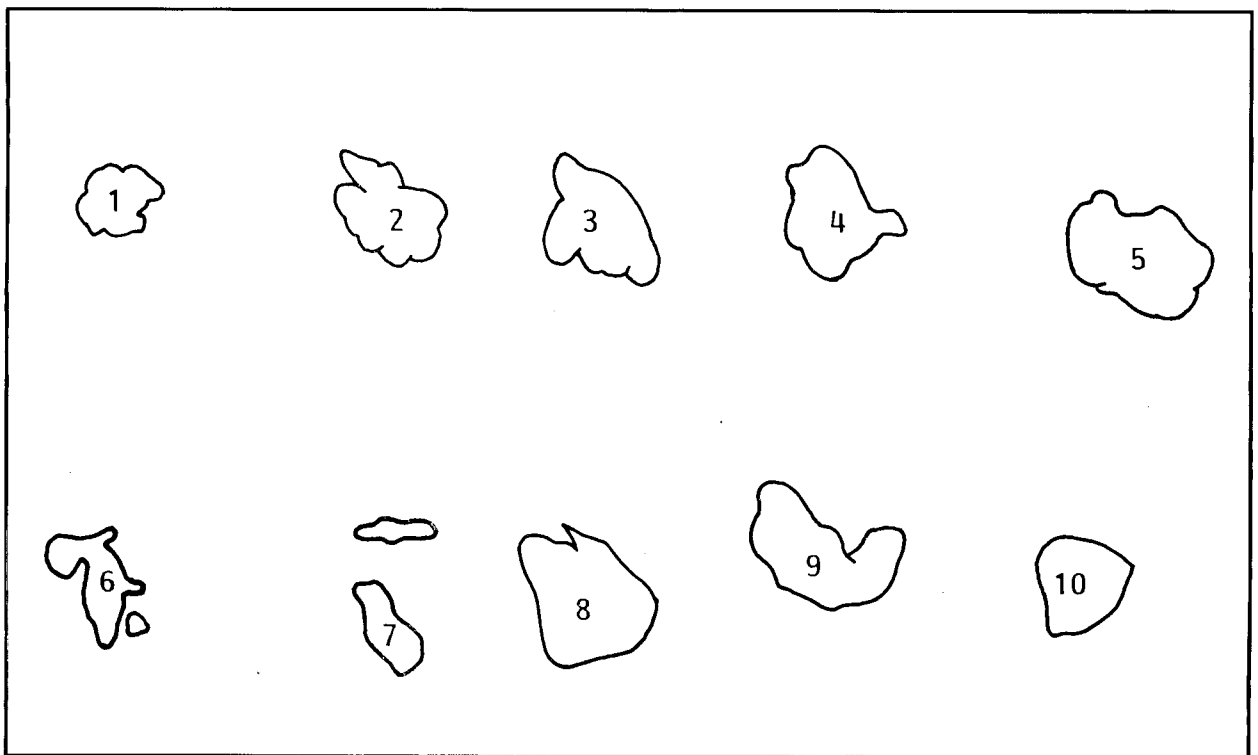
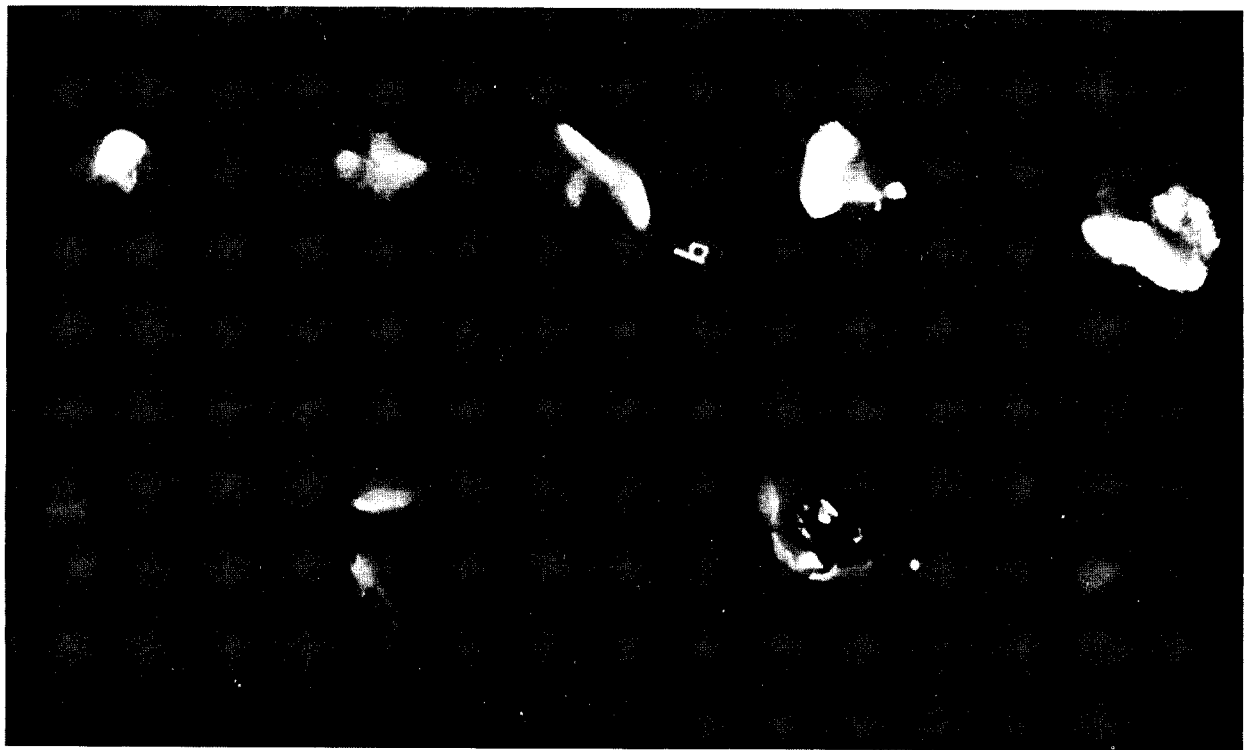
X-ray analysis

Lateral X-rays of the thorax showed accumulation of CaWO_4 particles in the paravertebral costal sinuses; parasternal lymph nodes and retrocardiac pleural folds (Fig. 1). The presence of the tungsten marker in the retrocardiac pleural folds was confirmed at necropsy from day 1-7 after tungsten instillation. High resolution radiography of intrathoracic structures also showed preferential accumulation of CaWO_4 in the parasternal lymph nodes, parietal

pleura and in lung hilar lymph nodes (Fig. 2), but minimal amounts in paraaortic and subcarinal lymph nodes, the thoracic duct, visceral pleura and diaphragm (Fig. 2). High magnification views of the tungsten-positive nodes showed a non-homogeneous distribution of CaWO_4 in the nodal tissue. In fact, tungsten deposition followed a honeycomb-like pattern, i.e., the marker appeared to encircle tungsten-free areas of tissue perhaps corresponding to nodal follicles (Fig. 3).

Light microscopy

Tungsten inclusions were readily identified by light microscopy (see Fig. 4 showing parasternal lymph node 3 days after intrapleural deposition of CaWO_4). The subcapsular domains of the lymph node were the first site capturing tungsten particles, as observed at days 1 and 2 after intrapleural injection (Fig. 4). CaWO_4 was



1 — Right Pulmonary Hilar Node; 2 — Subcarinal Node; 3 — Left Pulmonary Hilar Node; 4 — Left Parasternal Node; 5 — Right Parasternal Node; 6 — Thoracic Duct; 7 — Para-Aortic Nodes; 8 — Diaphragm; 9 — Parietal Pleura; 10 — Visceral Pleura

Fig. 2. X-ray of nodal samples with accompanying line drawing 3 days after instillation of CaWO_4 into the pleural space. Tungsten is well seen in the parasternal lymph nodes and to a lesser extent in parietal pleura and hilar lymph nodes. Little or no CaWO_4 is seen in the thoracic duct; paraaortic nodes, diaphragm and visceral pleura.

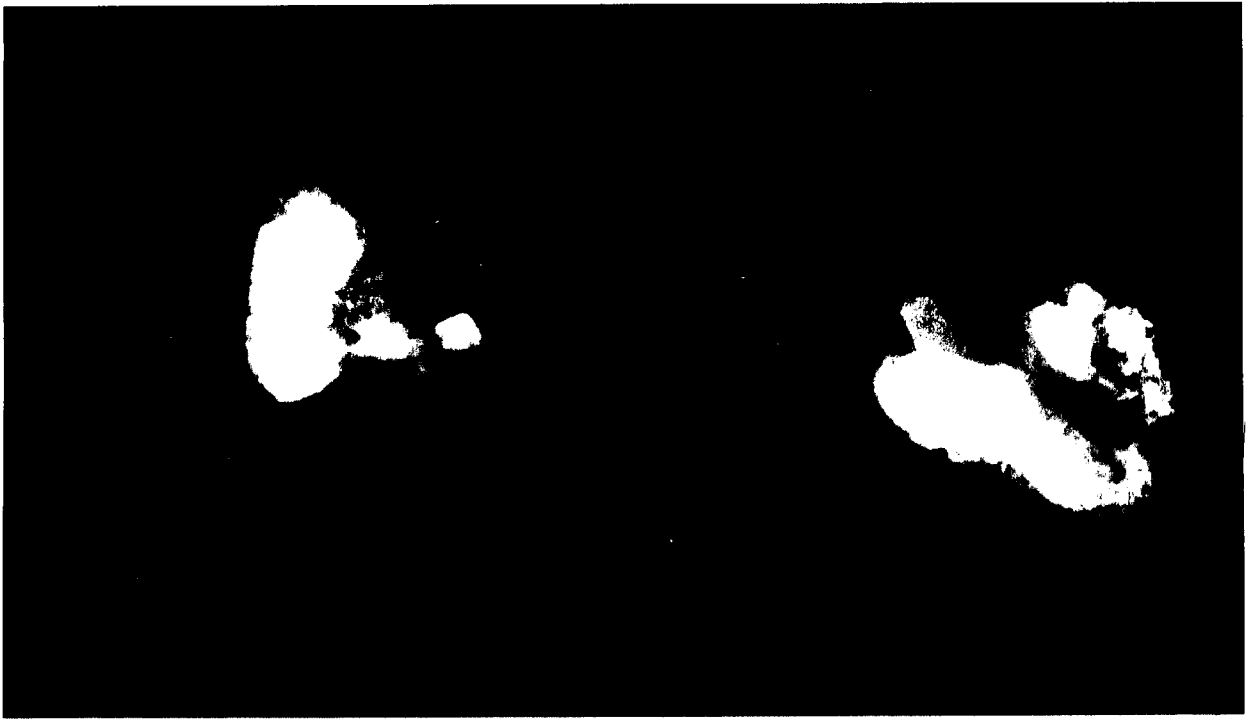


Fig. 3. Higher magnification of the parasternal nodes shown in Fig. 2 showing the inhomogeneous distribution of CaWO_4 , apparently encircling the nodal follicles.

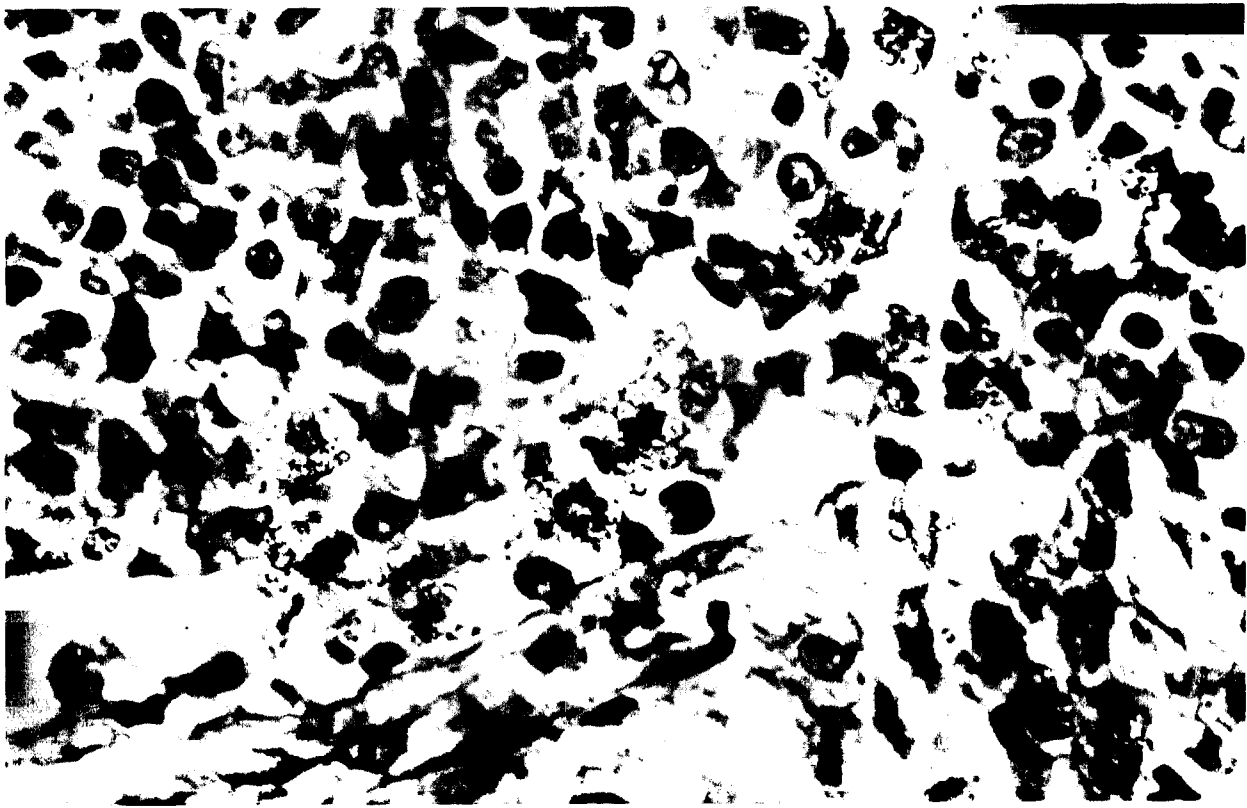


Fig. 4. Photomicrograph of parasternal lymph node collected 24 hours after the introduction of CaWO_4 into the pleural space. Tungsten inclusions are seen as translucent (yellow-green) inclusions. CaWO_4 is located in the subcapsular sinus mostly in a free form (magnification x400).

TABLE 1
Comparison of CaWO₄ Amounts in Six Different Intrathoracic Lymph Node Sites After Deposition of CaWO₄ into the Pleural Space

DAY	RPH	LPH	RPS	LPS	PAN	SCN
1	+	+	+++	+++	0	+
2	+	+	+++	+++	0	+
3	++	++	++++	++++	0	++
5	+++	++	+++	+++	+	+++
7	+++	+++	+++	+++	++	+++

RPH=right pulmonary hilar node; LPH=left pulmonary hilar node; RPS=right parasternal node; LPS=left parasternal node; PAN=para-aortic nodes; SCN=subcarinal node

also free in the extracellular space at days 1 and 2. Later (days 2 to 7) CaWO₄ permeated other histological domains of the lymph nodes, but seemingly spared the follicular zones. Rather, tungsten encircled the follicles, a finding in accordance with X-ray analysis of the lymph nodes (*vida supra*). At one week, tungsten inclusions were spread throughout the whole lymph nodal tissue. This sequence was most evident in the parasternal lymph nodes.

Semiquantitative assessment of the tungsten deposition in the different thoracic lymph nodal subgroups (*Table 1*) indicated that parasternal lymph nodes initially received substantial amounts of CaWO₄ with a peak of tungsten deposition at day 3. By day 3, tungsten was also detected, albeit in moderate amounts, in pulmonary hilar and subcarinal nodes. Between day 3 and day 7, tungsten deposition decreased in the parasternal nodes and increased in the pulmonary hilar and subcarinal nodes. Paraaortic nodes showed tungsten deposits only at 7 days after intrapleural instillation of CaWO₄.

Scanning electron microscopy (SEM)

By coupling X-ray elemental analysis to the SEM apparatus we confirmed that the inclusions identified as tungsten particles by light microscopy corresponded to elemental tungsten. The general features of tungsten

distribution in lymph nodal zones as described for light microscopy were verified by SEM.

DISCUSSION

We chose CaWO₄ as a particle marker because it is water-insoluble, non-antigenic and an exceedingly rare component of the normal breathing atmosphere. Moreover, this particulate is composed of tetragonal crystals that are small enough (less than 10 μ) to be absorbed by the pleural lymphatics. CaWO₄ is also readily identifiable by light microscopy because of its auto-fluorescence and refringency (expressed by a yellow-green color) and can be specifically identified by scanning electron microscopy as elemental tungsten. Finally, CaWO₄ is a heavy metal salt readily detectable by X-ray analysis.

After instillation of CaWO₄ into the pleural space, there were specific kinetics and pathways for particulate clearance. Initially, parasternal lymph nodes received the tungsten powder as well as milky spots of the retrocardiac pleural folds. After 3 days a general permeation of several lymph node groups occurred during this second phase of particle clearing. Accumulation of the tungsten marker in the paravertebral costal sinuses, parasternal lymph nodes and retrocardiac pleural folds (demonstrated by presacrifice X-ray) confirmed a distribution

pattern described previously in the dog using a radiolabeled marker (10). The localization pattern of the tungsten marker favored the existence of powerful absorptive processes in these sites (11,12), that is, in the dependent areas of the pleural cavity and in the extracostal regions (2).

Clearance of calcium tungstate particles from the pleural space of the dog is relatively rapid (day 1 and even by 12 hours), and initially is primarily into the parasternal lymph nodes, suggesting that this lymph nodal subgroup is a major absorption site for the pleural space (periods before 12 hours were not examined). This rapid absorption of pleural particles is in contrast with the observations of Courtice and Simmonds (7) who maintain that particle clearance from the pleural space is via the mediastinal pleura, a site which drains to the pulmonary and tracheobronchial lymph nodes (13). The rapidity of pleural particulate absorption is probably related to the large concentration of lymphatic vessels in the parietal pleura, and also to the existence of specialized mesothelial and diaphragmatic structures (i.e., stomas and milky spots that vigorously transport intrapleural particles) (14-18).

The rapid kinetics of CaWO_4 particle clearance from the pleural space is in distinct contrast to the slow absorption of CaWO_4 particles from the bronchoalveolar space into regional lymph nodes. The slowness of the latter phenomenon is probably attributable to the paucity of lymphatics in the alveolar membrane (9). At 24 hours after intrapleural particle injection, CaWO_4 appears in the marginal sinuses of the parasternal lymph nodes chiefly in the extracellular space. From day 3 to day 7, the particles are subsequently seen inside cells of the follicular area of the outer cortex, in the paracortex and finally inside the follicular domains of the lymph node. This nodal distribution of tungsten conforms with previous findings in popliteal nodes after injection of carbon particles under the skin of sheep (19). By day 7 after pleural space instillation, tungsten particles permeate all zones of the lymph node. Some CaWO_4 particles are located inside macrophages,

suggesting transport by phagocytes from the non-follicular regions (i.e., marginal, interfollicular and medullary domains) where CaWO_4 is first identified in the follicles.

Semiquantitative analysis (Table 1) indicated that by day 3 several intrathoracic lymph node subgroups contained different amounts of absorbed tungsten. By day 7, however, tungsten was evenly distributed among all the intrathoracic lymph node subgroups. Of interest, dissemination of CaWO_4 within the thorax was accompanied by a notable decrease in tungsten in the parasternal lymph nodes suggesting that after day 3 further absorption and dissemination of the tungsten marker originated from this nodal subgroup. This interpretation differed with earlier work (7,13), which suggested that subcarinal and pulmonary hilar nodes were the primary lymph nodal drainage pathway of the mediastinal pleura. Our data were more in accordance with the interrelated network model of the intrathoracic lymph circulation as proposed by von Hayek (20). A small component of CaWO_4 can also reach the hilar nodes via the lung parenchyma (5,6).

Identification of tungsten particles in retrocardiac pleural folds as early as 24 h after CaWO_4 instillation into the pleural space, suggests a key role of these folds in the local mechanisms of host defense. The pleural cavity is efficient in the clearing of exogenous agents, a phenomenon previously attributed to the presence of milky spots in the lower mediastinum (16,21). Milky spots were first described by von Recklinghausen (22) in the rabbit and represent a capillary network surrounded by an aggregate of macrophages, lymphocytes, and plasma cells (23). These milky spots are uniformly observed in the retrocardiac pleural folds of the dogs studied suggesting that in the canine they are distributed similarly to that in the rabbit (22) and in the white rat (16). The appearance of the tungsten marker as early as 24 h after pleural space instillation in the milky spots (well seen in necropsy) suggests that milky spots are also pivotal to efficient clearance from the pleural space.

The nature of milky spot cellular composition also implies that they have an important immunologic role in the overall intrathoracic defense mechanisms of the host (24) and similar to that proposed for milky spots of the greater omentum (25).

In conclusion: 1) the clearance of particles from the pleural space into regional lymph nodes is much faster than bronchoalveolar particulate clearance; 2) milky spots of pleural folds are important contributors to the clearance of exogenous particles; 3) the parasternal lymph node subgroup is initially the chief drainage pathway for intrapleural particles; and 4) essentially all thoracic lymph nodal subgroups ultimately receive exogenous particles introduced into the pleural space.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Artur Águas for his collaboration in the text revision and permanent constructive advice. The technical assistance of A. Ribeiro, Costa e Silva, E. Monteiro, J. Aurélio, A. Lagrifa, and L. Nogueira is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Daniele, RP: The pleura in local and systemic immune disorders. In *The Pleura in Health and Disease*, Chr*tien, J, J Bignon, A Hirsch (Eds.), New York, Dekker, 1985, 369-383.
2. Miserocchi, G: Pleural pressures and fluid transport. In: *The Lung: Scientific Foundations*. Crystal, RG, JB West, PJ Barnes, et al (Eds.), New York, Raven Press, 1991, 885-893.
3. Zocchi, L, E Agostoni, D Cremaschi: Electrolyte transport across the pleura of rabbits. *Respir. Physiol.* 86 (1991), 125-138.
4. Burke, HE: The lymphatics which drain the potential space between the visceral and the parietal pleura. *Am. Rev. Tuberc.* 79 (1959), 52-65.
5. Pereira, AS, N Grande, A Ribeiro, et al: Experimental study of clearance of particles from the pleural space. *Surg. Rad. Anat.* 13-2 (1991), 27S.
6. Pereira, AS, N Grande, E Carvalho, et al:

Evidence of drainage of tungsten particles introduced in the pleural space through the visceral pleura into the lung parenchyma. *Acta Anatomica* (1992) (in press).

7. Courtice, FC, WJ Simmonds: Physiological significance of lymph drainage of the serosal cavities and lungs. *Physiol. Rev.* 34 (1954), 419-448.
8. Hagiwara, A, T Takahashi: A new drug delivery system of anticancer agents: Activated carbon particles adsorbing anticancer agents. *In Vivo* 1 (1987), 241-252.
9. Grande, NR, CM Sá, AP Águas, et al: Time course and distribution of tungsten laden macrophages in the hilar lymph nodes of the dog lung after experimental instillation of calcium tungstate into the left apical bronchus. *Lymphology* 23 (1990), 171-182.
10. Miserocchi, G, M Pistolesi, M Miniati, et al: Pleural liquid pressure gradients and intrapleural distribution of injected bolus. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 56-2 (1984), 526-532.
11. Miserocchi, G, E Mariani, D Negrini: Role of the diaphragm in setting liquid pressure in serous cavities. *Respir. Physiol.* 50 (1982), 381-392.
12. Miserocchi, G, T Nakamura, E Mariani, et al: Pleural liquid pressure over the interlobar mediastinal and diaphragmatic surfaces of the lung. *Respir. Physiol.* 46 (1981), 61-69.
13. Kim, KJ, AM Critz, ED Crandall: Transport of water and solutes across sheep visceral pleura. *Am. Rev. Respir. Dis.* 120 (1979), 883-892.
14. Wang, NS: The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am. Rev. Respir. Dis.* 111 (1975), 12-20.
15. Maximow, AA: Relation of blood cells to connective tissue and endothelium. *Physiol. Rev.* 4 (1924), 533-563.
16. Corray, GH: Defensive mechanisms in the mediastinum, with special reference to the mechanics of pleural absorption. *J. Pathol. Bacteriol.* 61 (1949), 551-567.
17. Burke, HE: The lymphatics which drain the potential space between the visceral and the parietal pleura. *Am. Rev. Tuberc.* 79 (1959), 52-65.
18. Choné, B: Mesotheliale radiogold-inkorporation im submikroskopischen bild. *Fortschr. Roentgenstr.* 105 (1966), 566-578.
19. Heath, TJ, R Kerlin, H Spalding: Afferent pathways of lymph flow within the popliteal node in sheep. *J. Anat.* 149 (1986), 65-75.

20. von Hayek, H: *Die Menschliche Lunge. 2. Erganzte und Erweitert Auflage.* Berlin, Springer-Verlag, 1970.
21. Hirsch, A, JF Bernaudin, M Nebut, et al: Le mesothelium pleural: Structure et fonctions. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 12 (1976), 387-406.
22. von Recklinghausen, F: Uber Eiter-Bindegewebskorperchen. *Virchows Arch. Pathol. Ana.* 28 (1863), 157-166.
23. Carr, I: The fine structure of the cells of the mouse peritoneum. *Z. Zellforsch.* 80 (1967), 534-555.
24. Kanazawa, K: Exchanges through the pleura-cells and particles. In: *The Pleura in Health and Disease.* Chrétien, J, J Bignon, A Hirsch (Eds.), Marcell Dekker, Inc., New York, 1985, 195-231.
25. Shimotsuma, M, M Kawata, A Hagiwara, et al: Milky spots in the human greater omentum—Macroscopic and histological identification. *Acta Anat.* 136 (1989), 211-216.

Nuno R. Grande, M.D., Ph.D.
Sector de Morfologia Normal
Instituto de Ciencias Biomédicas
Abel Salazar
Largo Prof. Abel Salazar, 2
4000 Porto, PORTUGAL

5

**ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS
MANCHAS LEITOSAS DA
P L E U R A**

MODULATION OF THE REACTIVITY OF PLEURAL MILKY SPOTS IN THE RAT

António. de Sousa Pereira¹, Artur P. Águas^{1,2}, José.M. Cabral^{1,3} and Nuno R. Grande¹

1 -Department of Anatomy, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Portugal.

2 - Center for Experimental Cytology, University of Porto.

3 -Pathology Department, Hospital of Santo António, Porto, Portugal.

Author to whom correspondence should be adressed:

**Nuno R. Grande, M.D., Ph.D.
Professor and Chairman
Sector de Morfologia Normal
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Largo Prof. Abel Salazar
4000 Porto
Portugal
Phone: 351-2-310359
Telefax: 351-2-2001918**

Key Words: Milky Spot - Pleura - Freund's adjuvant - Mast cell - Macrophage -Reticulin fibers - Fibrosis - Rat

SUMMARY

We have studied the response of milky spots of the rat parietal pleura to intrapleural instillation of immunomodulatory agents such as complete or incomplete Freund's adjuvants and betametasone. Both incomplete (mineral oil) and complete (mineral oil plus dead mycobacteria) adjuvants induced a striking increase in the size and cellularity of the pleural milky spots whereas betametasone cause a slight atrophy of milky spots. The extensive inflammatory infiltrates observed after adjuvant injection were different between milky spots reactive to complete and incomplete Freund's adjuvants. Fifteen days after adjuvant administration, the pleural milky spots of rats were still enlarged and hypercellular but differences were noted in the size of milky spots of the pleura between the two groups studied. At the same timing the group treated with complete Freund's adjuvant showed an increase in the size of milky spots when compared with that measured at day 3, while the size of milky spots of the incomplete Freund's adjuvant treated group showed a decrease at day 15 when compared with data from day 3. The milky spots at day 15 were well organized: reticulin fibers permeated the whole area of the milky spot and the different cell types were evenly distributed. Histiocytes, which were previously confined to the inner layer, were now the main cell type in all areas of milky spots. A moderate number of mast cells and a few eosinophils were also seen. Complete Freund's adjuvant caused the formation of granulomas in the milky spots, a change that was not detected in animals treated with the incomplete adjuvant. Our data indicate that milky spots are areas of the parietal pleura with an elective role in the mounting of local inflammatory reactions of the pleural space. Milky spots may, therefore, be considered as important defense structures of the pleural membranes, reacting in accordance with the nature of the stimuli reaching the pleural space.

INTRODUCTION

The milky spots (MS) of the pleural space were first described by von Recklinghausen in 1863 in the rabbit (von Recklinghausen, 1863), and their presence was documented later in the pleural leaflets of several animals (Maximow, 1927; Mixer, 1941). Identical structures have been found in other locations, for instance in the human greater omentum (Seifert, 1921). In 1901, Marchand first suggested that these MS might have a phagocytic function (Marchand, 1901); these phagocytic capacities were confirmed subsequently in other studies using different particles introduced in the pleural space (Webb, 1931; Kanazawa et al., 1979; Shimotsuma et al., 1991; Pereira and Grande, 1992).

In the pleura the MS are confined to the parietal leaflet. In laboratory animals the MS are particularly numerous in the retrocardiac pleural folds, an area of the parietal pleura that goes from the pericardium to the diaphragm. These pleural areas are the same where we have recently found accumulation of particles injected in the pleural space of dogs (Pereira and Grande, 1992). In humans the retrocardiac pleural folds do not exist and MS are found in the pleura that is located over the esophagus and aorta (Kampmeier, 1928). This different positioning of MS in man is probably related with the rotation to the left of the heart during the fetal life. The human newborn presents also MS in the pleural adipose organs located in the parietal pleura (Aharinejad et al., 1992).

Based on findings in the omentum it was proposed that MS may have the function of an intestinal thymus (Kotten and Otter, 1992), though the MS was also considered to be no more than rudimentary regional lymph nodes (Shimotsuma, 1992; Beelen, 1992). So far little attention has been paid to the study of

functional features of the MS of the pleura despite the proposed protection of the mediastinum from noxious agents reaching the pleural space (Cooray, 1949). Their presence was taken as a cause for the very low frequency of mediastinitis detected in large series of autopsies when compared with the frequency of pleural diseases (Cooray, 1949).

The purpose of the current experimental study was to investigate the dynamics of MS of the pleural space, namely the response of these structures to immunomodulatory stimuli reaching the pleural space.

Accordingly, in this work we have investigated the structural changes of MS of the rat pleura in response to the instillation of well known immunomodulators. For that we have studied by light and electron microscopy the structural changes of MS of the rat pleura in response to the intrapleural instillation of an immunosuppressive drug (betametasone) and of adjuvants that cause strong B cell (incomplete Freund's adjuvant) or T cell (complete Freund's adjuvant) responses. We focused our attention on the MS located in the retrocardiac pleural folds because in the rat they are particularly numerous in this location, an area where substances introduced in the pleural space accumulate.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty five rats were used in this study. The animals were divided in 4 groups of 10 rats each and an additional control group of 5 animals was also employed. Each of the 4 groups of 10 animals were injected in the right pleural space through the fourth intercostal space, at the level of the anterior axillary line, either with 100 μ l of complete Freund's adjuvant (85% of paraffin oil and 15% of mannide monooleate containing 1 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis*, H37Ra, ATCC 25177, Sigma, F-4258), or incomplete Freund's adjuvant (85% of paraffin oil and 15% of mannide monooleate, Sigma, F-5506), or betametasone (100 μ g) or physiological saline (control). The additional control group of 5 animals was left untreated. The rats were sacrificed 3 (72 h) and 15 days after the injection in the pleural space (5 animals in each timing). The retrocardiac fold of the pleura was excised, fixed and processed for light microscopy and transmission electron microscopy.

Light microscopy

Whole retrocardiac pleural folds were fixed *in toto* in 10% formaldeyde and embedded in paraffin. Serial sections, 5 μ m thick, were obtained and stained by Giemsa, PAS (Periodic Acid-Schiff), MSB (Martius-Scarlet-Blue) and Manuel's method for reticulin (Prophet et al., 1992). The sections were observed in a Zeiss Axioplan microscope.

Fixation and Processment for Electron Microscopy

The pleural folds were fixed in 0.1 M cacodylate buffer containing 4% formaldehyde - 1.25% glutaraldehyde - 10mM calcium chloride (Silva, 1984) for 24 hours at room temperature. In order to help identify and excise the small patches of MS out of the retrocardiac pleural folds, we added 0.5% methylene blue stain to the fixative solution. The samples were washed in cacodylate buffer and distilled water, and postfixed in a ferrocyanide-reduced osmium solution made up of 0.1% potassium ferricyanide and 1% osmium tetroxide in distilled water (Águas, 1982; Neiss, 1984). The specimens were washed in water, stained *in toto* in 1% uranyl acetate (Silva, 1973), dehydrated in graded ethanols, and embedded in Epon. Some excised aldehyde-fixed MS were postfixed in a routine (unreduced) osmium tetroxide solution (1% osmium tetroxide - 10 mM calcium chloride) and embedded in the hydrophilic resin LR White (London Resin Co., Ltd) or in Epon. All resin-embedded specimens were sectioned in a LKB ultramicrotome and the thin sections stained with uranyl acetate (Silva, 1973) and lead citrate (Reynolds, 1963). The preparations were viewed in a JEOL electron microscope.

Quantification of Milky Spot Size

We have determined the average width of MS in paraffin sections of pleural folds from the different experimental groups of rats. For that, we have chosen sections done perpendicularly to the MS surface and we measured at random the width of 3 MS per animal in at least 3 animals of each group. Statistical comparison of the quantitative values obtained was made using the Student's *t* test. The numerical data obtained in the different groups of animals are represented in Figure 1.

RESULTS

Pleural MS of Untreated Rats

In the control groups of rats (untreated and saline instilled animals) the MS were composed of small aggregates of cells surrounding a vascular core and lined by mesothelial cells of the parietal pleural leaflet. The cell population of the MS of the control groups was composed mainly of histiocytes, plasma cells, mast cells and lymphocytes. They were located in between the mesothelial layer of the parietal pleura and the adipose tissue (Fig. 2).

Pleural MS of Incomplete Freund's Adjuvant Treated Rats

The incomplete Freund's adjuvant (IFA) treatment caused hyperplasia of the mesothelial layer that covered the MS. This reactive hyperplasia changed the morphology of the epithelium from a simple into a pseudostratified organisation. The phenomenon was more evident at day 3 (72h) than at day 15 after the treatment. Interestingly, at day 15, we also observed detachment of the mesothelial layer. The detachment was peculiarly confined to the MS areas.

In both timings after the IFA injection there was a striking enhancement in the size of the MS, and of its cellularity, which measured $296 \pm 150 \mu\text{m}$ at day 3 and $252 \pm 69 \mu\text{m}$ at day 15 whereas width of control MS was $72 \pm 25 \mu\text{m}$. This was the result of the attraction of inflammatory cells and also of the local response of the structural elements of MS. At day 3, we observed inflammatory infiltrates made up mostly of histiocytes and

lymphocytes. These infiltrates also contained neutrophils, eosinophils, mast and plasma cells. PAS staining revealed that the plasma cells showed no zonation in the MS. An increase in reticulin fibers was observed in the deeper areas of the MS.

By thin section electron microscopy, the plasma cells presented the characteristic hypertrophy of the rough endoplasmic reticulum and of the Golgi apparatus. Interestingly, there was extensive cell membrane interactions between the plasma cells and the connective tissue cells (Fig 6). Some of the stromal cells appeared to be binucleated, thus suggesting cell division.

At day 15 after the IFA treatment, the MS contained a large number of macrophages but no granulocytes. Reticulin fibers were seen scattered in the whole width of MS. No granulomas were found in these samples.

Pleural MS of Complete Freund's Adjuvant Treated Rats

The animals treated with complete Freund's Adjuvant (CFA) showed hyperplasia of the mesothelial cell layer and a striking increase in the size and cellularity of the MS that caused fusion of multiple individual MS, making an almost continuous cover of the surface of the pleural folds. This change was similar to what was observed in the IFA injected rats (Fig. 3). The marked inflammatory infiltrates that were observed at day 3 contained numerous histiocytes and mast cells. Mast cells were confined to the basal layer of the MS (fig. 4). Reticulin fibers were identified only in the deeper areas of the MS. In contrast with the IFA group, plasma cells were rarely seen in the MS of the CFA-treated rats. Eosinophils were present in the CFA treated rats although in fewer

numbers than in the IFA group. Electron microscopy observations of the MS at day 3 showed that mast cells and eosinophils were embedded in an unorganized connective tissue network that corresponded to the reticuline fibrosis seen by light microscopy. The connective tissue showed very irregular profiles that involved marked cell processes and indentations. Some of these cells appeared to be binucleated. Dead cells were detected either free in the stroma or inside macrophages.

At day 15 after the CFA administration, the MS remained hypercellular and showed the formation of granulomas (Fig. 5a and b). These were recognised because of the concentric organisation of cells of epithelioid nature and also because of the presence of a particular arrangement of the reticulin skeleton (Fig. 5b). Numerous multinucleated giant cells were also seen scattered in the MS. Blood capillaries, that were scarce at day 3, were now conspicuously seen in all of the MS, as well as the reticulin skeleton that at day 3 was confined to the basal layer. At day 15 we also found a rich vasculature associated with the blood supply of the hypercellular MS.

Our quantitative analysis of the MS width (Fig. 1) showed that CFA induced an enhancement in their size that was particularly evident 15 days after the adjuvant injection. At this timing the values for MS width was $259 \pm 100 \mu\text{m}$ which are significantly higher ($p < 0.01$) than those of controls ($72 \pm 25 \mu\text{m}$). Interestingly, at day 3 the width of MS from CFA treated rats ($130 \pm 63 \mu\text{m}$) was significantly lower ($p < 0.01$) than those of IFA injected animals ($296 \pm 150 \mu\text{m}$).

Pleural MS of Betametasone Treated Rats

The corticosteroid treatment led to a general hypocellularity of the pleural MS. The MS were already difficult to identify with the stereomicroscope that was used to collect the samples. This is because they contained only small aggregates of cells located underneath the mesothelial layer. The anti-inflammatory treatment also led to a marked change in the stroma of the retrocardiac pleural folds expressed by a differentiation of the adipose tissue from a multiloculated cell population into an uniloculated one. On average the values of width of MS of this group of rats were lower ($50 \pm 24 \mu\text{m}$) than those of controls ($72 \pm 25 \mu\text{m}$); the two groups were not, however, statistically different.

DISCUSSION

We have investigated here the response of the milky spots (MS) of the retrocardiac folds of the pleura to different kinds of immunomodulatory substances. The pleura is a serosal membrane that contains lymphoepithelial formations, known as MS, which are scattered in its parietal leaflet. In man, these bodies were demonstrated in the human mediastinal pleura by Kampmeier (Kampmeier, 1928), and in the chest wall of newborns (Aharinejad et al., 1990). Their role in the overall physiopathology of the pleura and of pleural space is often neglected or misunderstood (Antony et al., 1992).

A number of recent studies were devoted to the cellular composition of the omental and mediastinal MS (Beelen et al, 1980; Shimotsuma, 1991; Inoue and Otsuki, 1992). Little attention has been, however, focused on the dynamics of the pleural MS under different experimental conditions. Therefore, we have investigated here the response of these MS to the presence in the pleural cavity of well characterized immunomodulators. Having the rat as our animal model, we performed intrapleural instillations of incomplete Freund's adjuvant (IFA), of complete Freund's adjuvant (CFA) and of a corticosteroid (betametasone). These substances were chosen because their action on the immune system has been well established in a number of previous studies (Herbert, 1968; Warren et al., 1986; Woodard, 1990). In fact, IFA is known to cause a strong inflammatory reaction that is associated with a nonspecific stimulation of humoral immunity, whereas the inflammation produced by CFA induces a marked cellular immune reaction due to the mycobacterial antigens contained in the adjuvant (Bomford, 1980). In

contrast, the corticosteroid betametasone causes suppression of local immune reactions (Salman and Rose, 1990).

We have quantified the effect of intrapleural administration of these substances in pleural MS. This quantification was done by measuring the width of MS instead of counting individual MS because the latter type of quantification was not possible in the adjuvant's stimulated animals. Since the increase in size of MS led to fusion of individual MS, into a single layer on the retrocardiac pleural folds. We thus performed quantitative evaluation of the MS width which revealed striking differences of the effect of the 3 immunomodulatory agents on the size of MS. As expected from an immunocompetent structure, the reaction of MS to CFA and IFA was not identical. In fact, the CFA induced a sustained reaction without reduction in the size of MS at day 15 whereas the IFA caused an acute reaction, that was expressed by a greater width of the MS at day 3 than at day 15. Also as expected, the injection of the immunosuppressive betametasone resulted in reduction of the average MS size.

In our experiments, we found on one hand that the IFA treatment led to the presence of a significant number of plasma cells, which were not observed in CFA samples, and on the other hand that numerous granulomas were found in MS after the injection of CFA in the pleural space. The high reactivity of the MS to either of the two inflammatory adjuvants did not involve the formation of cell clusters, in contrast with what has been reported for omental MS (Shimotsuma et al., 1992). Mast cells had, however, a particular topography in the CFA-induced hypercellular MS since they were located in the basal portion of the MS, an area that depicted a rich reticulic skeleton. These different locations

of mast cells in the IFA and CFA treated rats may be related to different pathways of mast cell activation: an antigenic pathway that involves the preliminary binding of immunoglobulin E, and a non-antigenic pathway described in the rat peritoneal mast cells (Landry et al., 1992). The methods used in our work did not allow however to separate different mast cell populations in our samples.

Interestingly, the connective tissue fibers were initially absent from the areas of MS growth but they were later seen penetrating the whole width of the lymphoid patch. These observations suggest that, in the long term, a localized area of reticuline fibrosis may persist as an indication of a previous local immune reaction.

The investigation of the immunophysiology of pleural MS, is a particularly timely endeavour because of the recent publication of contradictory views on the nature of MS. In fact Kotten and Otter, proposed that MS may function as an intestinal thymus (Kotten and Otter, 1992) whereas Shimotsuma and Beelen saw no foundations to consider MS no more than rudimentary regional lymph nodes (Shimotsuma, 1992; Beelen, 1992). All of these previous interpretations were based on results using MS of the omentum.

A recent study of us on the mechanisms of clearance of the pleural cavity of the dog has revealed a crucial role of the retrocardiac pleural folds MS in the depuration of particles present in this serosal space: we found large quantities of tungsten particles inside MS macrophages after the instillation of a suspension of tungsten powder in the pleural space (Pereira and Grande, 1992). Taken together with our current findings, namely the absence of a clear cell cluster zonation of the MS, our data make us favor the previous proposal of Shimotsuma and Simpson

Morgan (1991) and Beelen (1992) who have sided against a thymus-like function for MS.

In conclusion, the structural features that we have observed in the reactive MS indicate they are able of mounting both a strong humoral (as in IFA-treated rats) or cellular (as in CFA-treated rats) immune response. This offers good evidence that MS work as a fully capable lymphoepithelioid organ reacting in accordance with the nature of the stimuli present in the pleural space and may, therefore, protect the mediastinum from noxious agents coming from the serosal space.

ACKNOWLEDGEMENTS

The technical assistance of António Moreno, M. João Oliveira, A. Costa e Silva, Emanuel Monteiro, José Aurélio Mexedo and Duarte Monteiro is gratefully acknowledged. We also thank the Service of Experimental surgery (ICBAS) for technical help. This investigation has been supported by grants from the Portuguese Research Council (JNICT).

REFERENCES

- Águas AP (1982) The use of osmium tetroxide potassium ferrocyanide as an extracellular tracer in electron microscopy. *Stain Technology* 57:69-73
- Aharinejad S, Franz P, Firbas W (1990) The milky spots on the chest wall of newborns. *Acta Anat* 138:341-347
- Antony VB, Sahn SA, Mossman B, Gail DB, Kalica A (1992) Pleural cell biology in health and disease. *Am Rev Respir Dis* 145:1236-1239
- Beelen RHJ (1991) The greater omentum: physiology and immunological concepts. *Neth J Surg* 43:145-149
- Beelen RHJ (1992) Role of omental milky spots in the local immune response. *The Lancet* 339:689
- Beelen RHJ, Fluitsma DM, Hoefsmit ECM (1980) The cellular composition of omental milky spots and the ultrastructure of milky spot macrophages and reticulum cells. *Journal of the Reticuloendothelial Society* 28(6): 585-599
- Bomford R (1980) The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. *Clin Exp Immunol* 39: 426-434.
- Cooray GH (1949) Defensive mechanisms in the mediastinum with special reference to the mechanics of pleural absorption. *J Path Bact* LXI:551-567
- Herbert WJ (1968) The mode of action of mineral-oil-emulsion adjuvant on antibody production in mice. *Immunology* 14: 301-309.

- Inoue N, Otsuki Y (1992) Lymphocyte subpopulations in mediastinal milky spots of mice: light and electron microscopic immunohistochemical observations; Arch Histol Cytol 55(1):89-96
- Koten JW, Otter WD (1991) Are omental milky spots an intestinal thymus?. Lancet 338:1189-1190
- Kanazawa K, Roe FJC, Yamamoto T (1979) Milky spots (Taches laiteuses) as structures which trap asbestos in mesothelial layers and their significance in the pathogenesis of mesothelial neoplasia. Int J Cancer 23:858-865
- Kampmeier OF (1928) Concerning certain mesothelial thickenings and vascular plexuses of the mediastinal pleura, associated with histiocyte and fat-cell production, in the human newborn. The Anatomical Record 39(2):201-213
- Landry, Y, Bronner C, Mousli M, Fisher T, Vallé A (1992) The activation of mast cells: molecular targets and transducing processes for antigenic and non-antigenic stimuli. Bull Inst Pasteur 90:83-98
- Marchand F (1901) Ueber clasmatocyten, mastzellen und phagocyten des netzes. Verh Dtsch Pathol Ges 4:124-131
- Maximow AA (1927) Ueber das mesothel (deckzellen der serosen haute) und die zellen der serosen exsudate. Untersuchungen an entzundetem gewebe und an gewebeskulturen. Arch Exp Zellforsch 4:1-42
- Mixter RL (1941) On macrophageal foci ("milky spots") in the pleura of different mammals including man. Am J Anatomy 69:159-186
- Neiss WF (1984) Electron staining of the cell surface coat by osmium-low ferrocyanide. Histochem 80:231-242

- Pereira AS, Grande NR (1992) Particle clearance from the canine pleural space into thoracic lymph nodes: An experimental study. *Lymphology* 25: 120-128
- Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH (1992) Laboratory methods in histotechnology. American Registry of Pathology, Washington D.C.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol* 17:208-212
- Salman K, Rose LI (1990) Corticotropin and corticosteroids. In: DiPalma JR, DiGregorio GJ (eds) *Basic Pharmacology in medicine*. McGraw Hill international Editions. Singapore, pp 535-546
- Seifert E (1921) Zur biologie des menschlichen grossen Netzes. *Arch Klin Chir* 116:510-517
- Silva MT (1973) Uranyl salts. In: *Encyclopedia of microscopy and microtechnique*. Editor: P. Gray. New York, Van Nostrand Reinhold Co., pp. 585
- Silva MT (1984) The use of transmission electron microscopy of ultrathin sections for the characterization of normal and damaged bacterial membranes. In: FC Guerra and RM Burton (Eds). *Biomembranes: Dynamics and Biology*. Plenum Publishing Corp. New York, pp 1-36
- Shimotsuma M, Simpson-Morgan M (1991) Omental milky spots. *Lancet* 338:1596
- Shimotsuma M, Takahashi T, Kawata M, Dux K (1991) Cellular subsets of the milky spots in the human greater omentum. *Cell Tissue Res* 264:599-601
- Shimotsuma M, Itoh M, Sasabe t, Yoneiama C, Iwamoto A, Hagiwara A, Sawai K, Takahashi T (1991) Role of omental milky spots in peritoneal metastases of carcinoma. *Oncologia* 24(3):80-85

Shimotsuma M, Shirasu M, Hagiwara A, Takahashi T, Siels JW (1992)
Omental milky spots and the local immune response. *Lancet* 339:123

Warren H, Vogel FR, Chedil LA (1986) Current status of immunological
adjuvants. *Ann Rev Immunol* 4: 369-388.

Webb RL (1931) Peritoneal reactions in the white rat, with special
reference to the mast cells. *Am J Anat* 49: 283-334

Woodard LF (1990) Surface chemistry and classification of vaccine
adjuvants and vehicles. *Bacterial vaccines*. Alan R. Liss, New York,
pp 281-306.

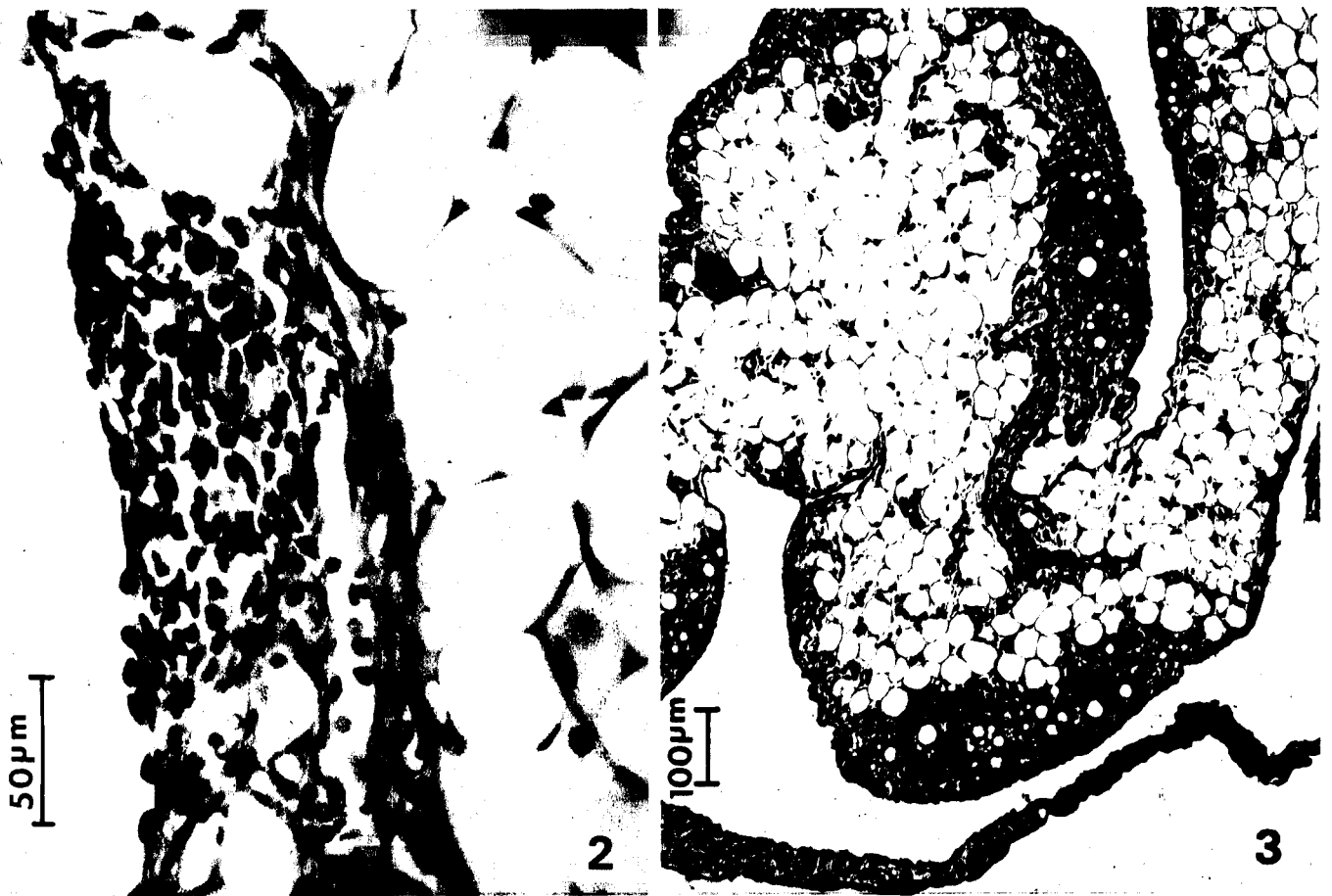
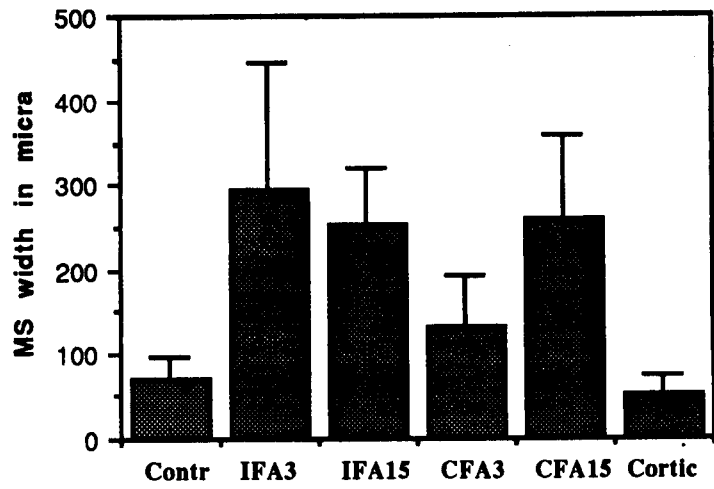
Von Recklinghausen F (1863) Uber eiter bindegewebskorperchen.
Virchows Arch Pathol Anat 28:157-166

LEGENDS

Figure 1 - Effect of intrapleural instillation of adjuvants (complete Freund's adjuvant, CFA and incomplete Freund's djuvant, IFA) and corticosteroid (betametasone) in the width of milky spots of the rat retrocardiac pleural folds. The values of milky spot width are represented as average \pm standard deviation. The treated rats were sacrificed 3 (72h) and 15 days after IFA and CFA injection and 3 days (72h) after corticoesteroid instillation.

Figure 2 - Light microscopy micrograph of a pleural MS from an untreated rat. This structure is made up of nests of mononuclear cells located in the submesothelial layer of the parietal pleura (MSB staining).X400

Figure 3 - Low magnification of an area of the retrocardiac pleural fold of a rat treated with IFA. The adjuvant caused fusion of adjacent MS thus resulting in a continuous layer of lymphoid tissue.X100



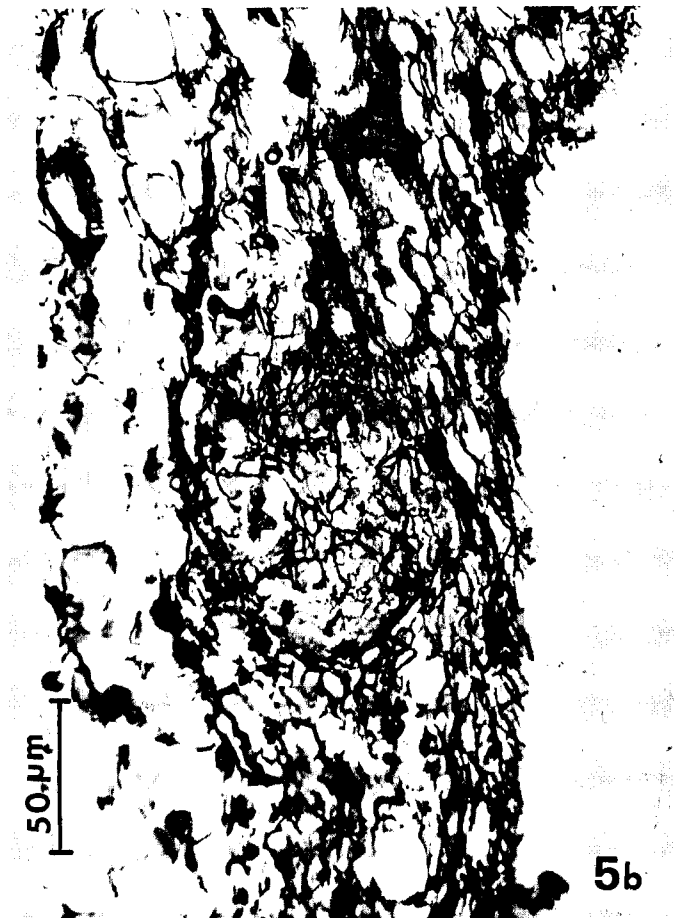
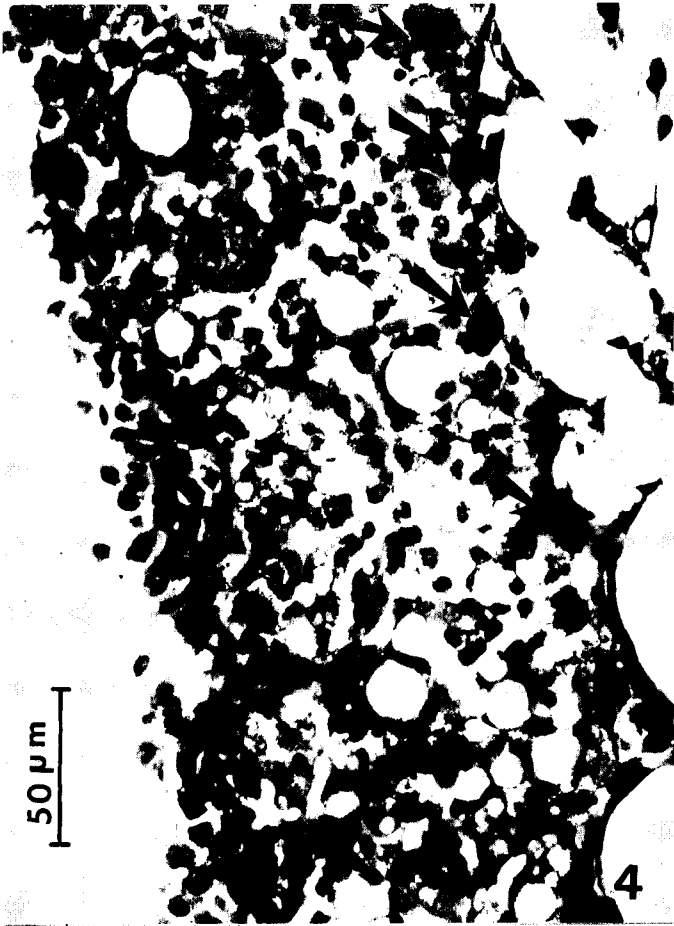


Figure 4 - Light micrographs of pleural MS from CFA-treated rats sacrificed 3 days after the intrapleural instillation of the adjuvant. The hypercellular MS shown in this micrograph (Giemsa staining) illustrates the peculiar accumulation of mast cells (arrows) in the basal area of the MS. X400

Figure 5 - (a and b) - Light micrographs of pleural MS from CFA-treated rats sacrificed 15 days after the intrapleural instillation of the adjuvant. A granuloma is observed in this section, stained with MSB. Reticulin fibers (Fig 5b) permeate the whole width of the granuloma. X 400

Figure 6 - Thin section electron micrograph illustrating exuberant cell membrane interactions between MS cells from a rat treated with IFA 3 days before sacrifice. The cell in the right side of the figure is a plasma cell showing unlarged cisterna of rough endoplasmatic reticulum due to the accumulation of immunoglobulins. X 14400

6

DISCUSSÃO

6.1 A escolha do(s) modelo(s) experimental(ais)

Na fase inicial do nosso trabalho estudamos a morfologia dos linfáticos pleuropulmonares em peças humanas obtidas no Instituto de Medicina Legal do Porto. Os linfáticos sub-pleurais das peças seleccionadas para estudo foram injectados com substâncias com diferentes características (metil-metacrilato, gelatina com tinta da china e gelatina com sulfato de bário) para serem estudados por dissecção e com auxílio de Raio X. Na fase seguinte, escolhemos o cão (*Canis familiaris*) como animal de experiência para a caracterização das vias e cinética da depuração de partículas exógenas introduzidas na cavidade pleural e do papel da célula mesotelial e dos linfáticos pleuropulmonares neste processo. Escolhemos este modelo animal porque a morfologia dos linfáticos pleuropulmonares do cão é muito semelhante à dos linfáticos do pulmão humano

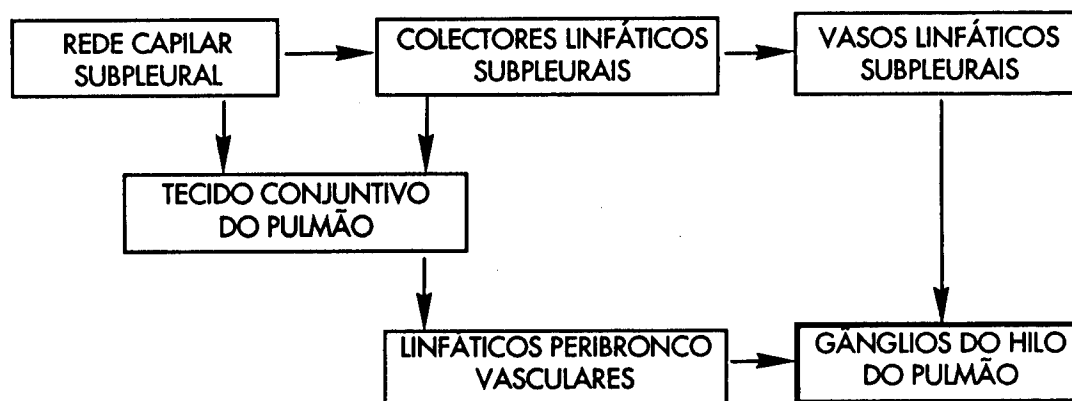


Fig. 6.1 - Drenagem linfática da pleura visceral do cão. Esquema adaptado de Nagaishi, 1972.

Com efeito embora o tecido conjuntivo subpleural tenha uma menor espessura que no Homem (o cão é um animal de pleura fina) a rede linfática subpleural é bem desenvolvida apresentando apenas como diferença fundamental em relação à do Homem uma maior regularidade do padrão geométrico. Tal como no Homem a rede linfática superficial no cão, dirige a sua linfa para os gânglios do hilo do pulmão através de duas vias alternativas; i) por

intermédio de colectores linfáticos que permanecem subpleurais até chegarem ao hilo (Nagaishi, 1972), embora possam afundar-se de quando em vez e voltar á superfície (Baum, 1918 cit por Nagaishi, 1972) e ii) através de vasos linfáticos que se introduzem no parênquima pulmonar (Mathis, 1938 cit por Nagaishi, 1972) e correm depois ao longo dos ramos da artéria pulmonar (Fig. 6.1).

O tamanho dos animais utilizados tornou também facilmente executável um conjunto de técnicas difíceis de executar noutros animais mais pequenos, nomeadamente a toracotomia através dos espaços intercostais, com visualização directa do folheto visceral da pleura, durante o procedimento operatório, factor importante para garantir a ausência de lesão iatrogénica deste folheto o que poderia influenciar os resultados obtidos.

Para o estudo da resposta dos milky spots a vários estímulos imunológicos, optámos pela utilização do rato Wistar, dado ser previsível a necessidade de utilizar um grande número de animais nestas investigações e termos constatado a inexistência de diferenças significativas entre a composição celular dos milky spots do rato e do cão.

No cão optámos por efectuar toracotomia em alternativa á punção da cavidade pleural para garantir que não eram provocadas soluções de continuidade na pleura visceral já que estas lesões poderiam falsear os resultados relativamente à passagem de partículas através da pleura visceral. No rato a opção pela punção da cavidade pleural fundamentou-se em duas ordens de razões. Em primeiro lugar, o rato foi usado exclusivamente para o estudo das manchas leitosas e portanto, a lesão accidental da pleura visceral não é crítica nesta situação. Em segundo lugar, a punção da cavidade pleural provoca lesões mínimas permitindo assim manter toda a dinâmica da função muscular torácica que é importante na condução das substâncias introduzidas na cavidade pleural em direcção aos locais onde se localizam preferencialmente as manchas leitosas.

6.2 Comentários às técnicas utilizadas

No nosso trabalho utilizamos algumas técnicas que pensamos terem sido adoptadas pela primeira vez em estudos deste tipo, nomeadamente o método de mumificação de pulmão humano, referido em detalhe na nossa publicação incluída no Capítulo II. Também a utilização da radiologia recorrendo ao mamógrafo e película de elevada resolução é inédita em trabalhos referentes a estudos funcionais do sistema linfático. Tal foi possível dada a radiopacidade do marcador utilizado (tungstato de cálcio) e a ainda reduzida dimensão das suas partículas. O método tornou possível a leitura com grande precisão da distribuição do marcador no interior dos gânglios linfáticos.

O estudo das amostras por microscopia electrónica de varrimento usando a retrodifusão de electrões permitiu um rápido rastreio de extensas zonas da pleura relativamente à presença de marcador com localização intramesotelial. A natureza química e certificação de que as inclusões detectadas correspondiam a CaWO_4 foi obtida por microanálise *in situ* por Raios X (Figura 6.2). Tal objectivo, poder-se-á argumentar, seria também alcançado com a



Fig. 6.2 - Gráfico obtido por microanálise de Raios X de amostras contendo células mesoteliais carregadas de tungsténio

microscopia electrónica de transmissão, visto que o tungsténio é uma substância electrono-opaca originando uma mancha negra. No entanto muitas outras substâncias, em particular metais pesados podem originar imagens semelhantes em microscopia electrónica de transmissão pelo que esta técnica daria sempre informação presumptiva na identificação do tungsténio, ao invés do diagnóstico feito com a utilização da microanálise por Raios X que dá um diagnóstico preciso da natureza química da inclusão.

6.3 A escolha do marcador

O facto de o pó de tungsténio não estar associado a modificações histológicas significativas ao nível do pulmão (Cugell, 1992), poderá numa análise mais apressada, contraindicar o seu uso como marcador em estudos de patologia pulmonar. Com efeito experiências em que se procedeu à administração intratraqueal de pó de tungsténio ou pó de carboneto de tungsténio no ratinho e no cobaio durante semanas a meses, não mostraram a existência de qualquer alteração histológica significativa no pulmão (Harding, 1950). Experiências posteriores mostraram que, na chamada doença dos metais pesados, que aparece por exemplo nos polidores de diamantes, as lesões pulmonares encontradas se deviam não ao tungsténio mas ao cobalto que é utilizado juntamente com aquele na constituição dos abrasivos (Kaplum and Mezencewa, 1960; Delahant, 1955). Contudo, esta aparente desvantagem transforma-se num trunfo precioso para a sua utilização como marcador da clearance do espaço pleural, pois, como resultado da inactividade biológica que os vários autores concordam em atribuir ao tungsténio (Parkes, 1982) e da sua fraca antigenicidade (Grande e col, 1990), a resposta inflamatória pleural, que normalmente acompanha a presença de substâncias exógenas não se verifica, e o tungstato de cálcio pode seguir a trajectória normalmente seguida pelas substâncias depuradas a partir da cavidade pleural e desta forma marcar o trajecto seguido por estas. Tal marcação é possível dado o tungstato

de cálcio possuir um conjunto de características extremamente atractivas do ponto de vista organoléptico e que são: i) tamanho das partículas abaixo dos 10 μm , o que as torna suficientemente grandes para serem identificáveis à microscopia de luz mas suficientemente pequenas para serem absorvidas pelos vasos linfáticos, ii) é um metal pesado e como tal opaco ao Rx e portanto detectável com técnica radiográfica o que permite a sua detecção através de um método económico e expedito, iii) tem refringência amarelo-esverdeada ao microscópio óptico o que facilita a sua localização nos tecidos. O facto de o tungsténio ser um componente extremamente raro da atmosfera torna, improvável em extremo, que as partículas de marcador detectado nos animais tenha outra origem que não a partir das instilações da Ca WO_4 que executamos.

6.4 Resposta da cavidade pleural

O efeito da administração intrapleural de partículas de tungstato de cálcio na dinâmica da população celular dessa cavidade foi já caracterizado e quantificado pelo grupo de investigação em que me integro (Peão e col, 1992). Atenção especial foi dada às alterações no número relativo dos vários tipos celulares assim como à morfologia da interacção destas células com as partículas de tungstato de cálcio.

A administração intrapleural de partículas origina numa primeira fase um influxo para dentro da cavidade pleural de células inflamatórias. As partículas são rapidamente fagocitadas e gradualmente depuradas da cavidade serosa. Foi observado que, tal como se verifica aquando da administração de fibras de asbestos na cavidade peritoneal (Koerten e col, 1986), também no caso das partículas de tungstato há uma normalização da composição celular antecedendo o final do processo depurativo, o que poderá estar em relação com a fraca antigenicidade atribuída às partículas de tungstato de cálcio.

6.5 Avaliação do desempenho da célula mesotelial

O mesotélio é constituído por uma única camada de células escamosas de tamanho variável, ligadas entre si por complexos juncionais, que reveste a superfície das cavidades que derivam da cavidade celómica primitiva. Estas células possuem longas microvilosidades que flutuam no interior da cavidade pleural e estão separadas do tecido conjuntivo subjacente por uma fina membrana basal (Wang, 1975). No Homem a célula mesotelial pleural tem dimensões que variam entre $16,4 \pm 6,8$ a $41,9 \pm 9,5$ μm (Cooray, 1949), sendo um dos factores que influencia o seu diâmetro médio o grau de expansão da pleura. A forma da célula mesotelial é variável podendo ser cuboide, achatada ou colunar (Wang, 1985), sendo as variações da forma e de distribuição topográfica melhor observadas através da microscopia electrónica de varrimento (Wang, 1974).

As microvilosidades que caracterizam as células mesoteliais tem cerca de $0,1$ μm de espessura por 3 μm de comprimento (Albertine et al., 1982; Andrews e Porter, 1973; Baradi e Hope, 1964; Legrand et al., 1971; Mariassay e Wheeldom, 1983; Odor, 1954; Wang, 1974).

Vesículas de pinocitose são observadas quer junto ao polo basal quer junto ao polo apical das células. As células mesoteliais são ricas em organelos celulares, tornando-se ainda mais abundantes quando a célula é activada por um processo inflamatório (Legrand, 1971; Stoebner, 1970). No mesotélio pleural humano as junções intercelulares variam quer em número quer em tipo consoante a região da pleura estudada. As junções apertadas apicais estão sempre presentes, os desmossomas e hemi-desmossomas são principalmente visualizados quando existe uma situação inflamatória.

A densidade de microvilosidades na superfície mesotelial pleural é variável consoante a zona da pleura considerada, chegando a atingir 600 por μm^2 . A densidade de microvilosidades é maior na pleura visceral do que na parietal e tanto mais elevada quanto mais caudal é a região de pleura que é estudada.

A principal função atribuída às microvilosidades é a de reter no seu seio glicoproteínas ricas

em ácido hialurónico, especialmente no tórax inferior, com o objectivo de diminuir a fricção entre o pulmão e a parede torácica (Andrews, 1973; Wang, 1974), facilitando assim a dinâmica respiratória.

Os nossos resultados experimentais com injeções intrapleurais de tungstato de cálcio revelaram que a célula mesotelial tem capacidade para fagocitar partículas *in vivo*, participando assim na depuração do espaço pleural (Figura 6.3 e 6.4). Com efeito, além das vias normalmente referidas como sendo aquelas através das quais se faz a depuração de partículas presentes na cavidade pleural e que são os estomas, com as suas diferentes variedades morfológicas, e as manchas leitosas, os nossos resultados indicam que a célula mesotelial que recobre a pleura visceral também participa neste processo. É a seguinte a evidência experimental por nós obtida e que suporta a conclusão de que a pleura visceral participa na depuração da cavidade pleural: a) presença de células mesoteliais com inclusões intracelulares de tungstato de cálcio confirmadas por microanálise de raios X; b) presença de tungstato de cálcio nos vasos linfáticos e macrófagos de localização subpleural; c) presença de tungstato de cálcio no tecido linfóide broncoalveolar (BALT). Esta participação da célula mesotelial visceral na depuração de partículas presentes no espaço pleural, negada por numerosos autores (Astoul e col., 1990; Kanazawa, 1985; Wang, 1975; Hayek, 1970; Courtice e Simmonds, 1954; Courtice e Morris, 1953) afigurasse-nos de grande importância, dadas as implicações fisiopatológicas que encerra. Com base nestes resultados, e de um ponto de vista conceptual, é legítimo admitir que agentes infecciosos ou outros presentes na cavidade pleural possam disseminar-se para o parênquima pulmonar utilizando a via transmesotelial visceral. Trata-se de uma via de óbvias implicações fisiopatológicas. Em situação fisiológica dever-se-à entrar em linha de conta com a possibilidade da célula mesotelial da pleura visceral também participar de forma activa, ainda que não muito importante, na depuração deste espaço. O fenómeno que demonstramos era ignorado, até à publicação internacional dos nossos resultados, por parte dos autores que se dedicam ao estudo dos mecanismos de depuração de substâncias presentes no espaço pleural.

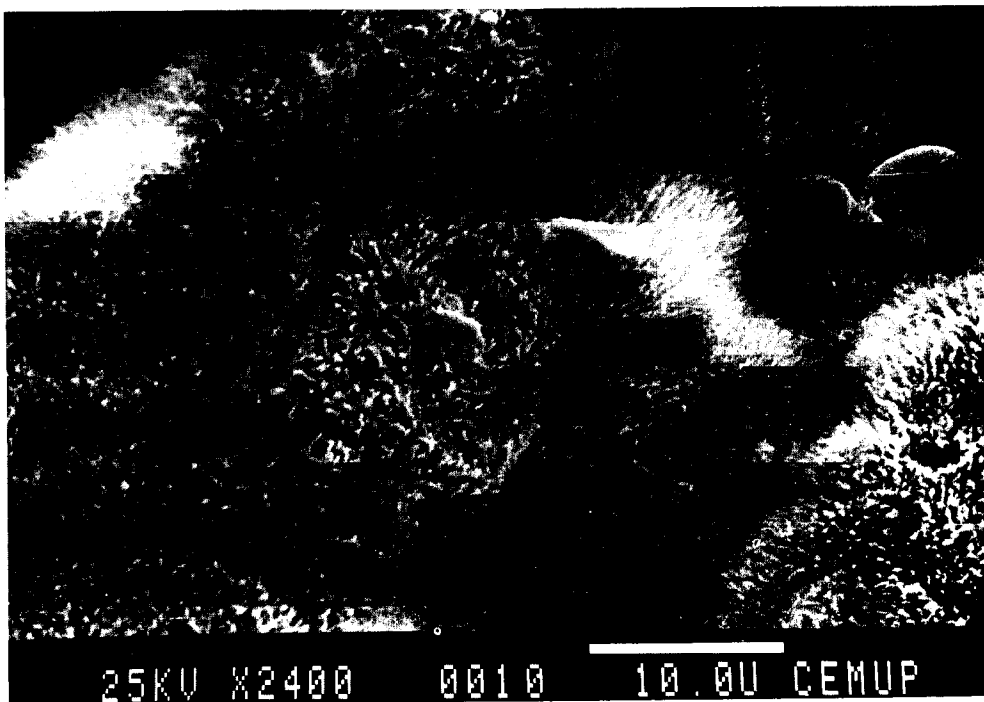


Fig. 6.3. - Microfotografia obtida com o microscópio electrónico de varredura mostrando uma célula mesotelial contendo uma partícula no seu interior.



Fig. 6.4. - Imagem obtida com electrões retrodifundidos da mesma área ilustrada na figura anterior. As inclusões de tungstato de cálcio aparecem como manchas de cor branca.

6.6 Envolvimento dos vasos linfáticos pleuropulmonares

Embora a pleura visceral possua uma vasta rede linfática, definida em detalhe por Grande e col. em 1983 e subsequentemente também por nós no capítulo II, não foi evidente nos nossos estudos uma participação significativa destes vasos na depuração do espaço pleural. Com efeito, embora o marcador por nós utilizado tenha sido encontrado no interior de vasos linfáticos da pleura visceral, foi-o em quantidades reduzidas, sugerindo, que a função principal da rede linfática da pleura visceral não é concerteza participar na depuração da cavidade pleural. Dado que nunca encontramos neste folheto estomas - as estruturas vocacionadas para a absorção directa para o interior dos vasos linfáticos - é nossa convicção que o aparecimento de partículas de tungstato de cálcio no interior de vasos linfáticos da pleura visceral se deve unicamente a uma transferência para o seu lumen de partículas já anteriormente fagocitadas por células do mesotélio visceral. O mecanismo pelo qual se processa a transferência de partículas do interior das células mesoteliais para o lumen dos linfáticos subpleurais deverá ser esclarecido, e será concerteza um dos nossos temas futuros de investigação.

A nossa convicção de que os linfáticos da pleura visceral não desempenham um papel significativo na depuração do espaço pleural é reforçada pelo facto de não encontrarmos manchas leitosas neste folheto da pleura, estando os estomas também ausentes. Será lógico então que nos interroguemos sobre o significado da densa rede linfática que é encontrada sob a pleura visceral. Em nosso entender, tal como no de outros autores (Grande e col, 1983), a rede linfática da pleura visceral não representa mais do que uma expansão da rede linfática profunda do pulmão com a qual aliás apresenta numerosas e evidentes conexões e afinidades histoquímicas, como foi demonstrado por nós e outros autores.

A razão de ser do seu aparentemente injustificado desenvolvimento, poderá ser encontrada, ainda que de forma especulativa, em estudos filogenéticos do sistema linfático. Nos répteis,

como o lagarto, a cobra e o crocodilo foi descrita uma organização anatómica do sistema vascular particularmente interessante: nestes animais os principais vasos sanguíneos como a aorta, as carótidas e as jugulares correm no interior de bem desenvolvidos vasos linfáticos. Atribui-se a esta organização a função de preservar a temperatura do sangue num ponto óptimo (o facto de serem considerados animais de sangue frio não se relaciona com a temperatura do seu sangue mas sim com a presença ou ausência de sistemas de controle de temperatura (Kotani, 1990)), e este seria um dos factores que explicam as baixas necessidades alimentares destes animais, dado saber-se que uma percentagem significativa daquilo que ingerimos se perde por produção de calor. Se recuarmos ainda mais na escala filogenética vamos encontrar nos anfíbios uma outra distribuição interessante dos linfáticos. Com efeito, nos anfíbios do género ANURA como o sapo e a rã, no espaço correspondente ao tecido conjuntivo liso subcutâneo são encontradas extensas almofadas linfáticas (Nose, 1931) que explicam porque a pele destes animais se pode facilmente descolar do corpo e extremidades. A função atribuída a estas almofadas linfáticas é a de preservar a temperatura corporal, impedindo a perda de calor graças á baixa conductividade térmica da linfa. É interessante estabelecer uma analogia entre estes achados e aquilo que se passa ao nível do pulmão. De facto, também o pulmão, um órgão eminentemente vascular, se encontra envolvido por uma extensa malha linfática. Como na natureza nada existe por acaso, poder-se-á especular que esta rede excepcionalmente desenvolvida de linfáticos pleurais possa representar um artificio que contribua para manter o pulmão a uma temperatura estável e óptima para aí se efectuarem as trocas gasosas.

6.7 Envolvimento ganglionar local versus regional

Os resultados experimentais por nós obtidos relativamente à depuração de partículas presentes no espaço pleural sugerem que esta se faz principalmente através da pleura parietal, presumivelmente através dos seus linfáticos, o que está de acordo com as conclusões a que chegaram diversos autores que se dedicaram a este tipo de estudos embora utilizando diferentes tipos de metodologias (Hirsch et al., 1976; Wang, 1975; Black, 1972; Cotran e Karnovsky, 1968). No entanto, os nossos dados não coincidem totalmente com os destes investigadores quanto ao papel relativo das várias áreas da pleura parietal neste processo. No nosso modelo, ao contrário do referido por esses autores verificámos que a pleura costal tem um papel preponderante no processo (Pereira e Grande, 1992). Não verificamos o mesmo em relação à pleura mediastínica e diafragmática às quais é atribuído por alguns autores (Courtice e Simmonds, 1954) o papel principal na depuração de partículas presentes neste espaço. A nossa proposta foi sugerida pela marcação electiva, pelo tungsténio depositado dentro do espaço pleural, dos gânglios linfáticos que drenam a linfa da pleura costal em vez dos gânglios que drenam a pleura mediastínica e diafragmática que são os traqueobrônquicos, os traqueais e os mediastínicos altos (Kim e col., 1979). Algumas das discrepâncias atrás enunciadas residirão porventura na natureza peculiar deste trabalho, que assenta numa base experimental e funcional ao contrário dos trabalhos de anatomia clássica que se fundamentam principalmente em estudos de natureza estática, nomeadamente na utilização de técnicas de injeção de linfáticos pleuropulmonares em material cadavérico (Caplan, 1990; Riquet, Hidden e Debesse, 1989; Caplan, 1987; Munka, Gregor e Durovicova, 1972; Penell e Salem, 1966; Trapnell, 1963; ; Hovelacque, 1912;).

A obtenção de um mapa do envolvimento sequencial dos vários grupos ganglionares do mediastino no processo de depuração pleural apresenta alguns pontos que merecem ser discutidos. A análise da tabela incluída no capítulo 5 mostra-nos que o primeiro grupo de gânglios linfáticos a receber partículas oriundas da cavidade pleural é o grupo dos gânglios

paraesternais que no cão, tal como no Homem, se localizam próximo do ângulo esternal. Neste grupo ganglionar a concentração máxima de marcador foi observada três dias após a introdução do mesmo na cavidade pleural. A partir do terceiro dia observámos uma marcação progressiva dos restantes grupos ganglionares do torax. Este aumento na intensidade de marcação dos diferentes grupos ganglionares torácicos fez-se em associação com uma redução na marcação do grupo paraesternal o que sugere uma redistribuição, ainda que parcial, do marcador a partir deste grupo. Este achado confere ao grupo paraesternal uma função preponderante na depuração do espaço pleural semelhante à postulada para o gânglio intertraqueobrônquico no processo de depuração broncoalveolar (Grande e col, 1990).

O atingimento do grupo ganglionar intertraqueobrônquico por partículas oriundas do espaço pleural parece assim reforçar a teoria segundo a qual a rede linfática do mediastino seria uma rede anastomótica em que uma vez atingida uma estrutura ganglionar haveria, em fases subsequentes, um envolvimento de todas as outras, funcionando o grupo ganglionar que se localiza sob a carina traqueal como plataforma de distribuição das partículas que entram na circulação linfática. Segundo esta proposta a circulação linfática pulmonar não é unidireccional mas sim bidireccional, em função das circunstâncias. O conhecimento da cinética de envolvimento das várias estruturas ganglionares do mediastino reveste-se ainda de importância clínica prática. Com efeito nos últimos anos tem sido várias as tentativas de encontrar formas eficazes de tratamento para o cancro do pulmão, que, como é do conhecimento geral tem actualmente uma elevada incidência no norte de Portugal, e para o qual não existem ainda formas eficazes de tratamento. Uma das tentativas terapêuticas ensaiadas nos últimos anos, consiste na administração intracavitária de citostáticos, nomeadamente a pefleomicina, um derivado da bleomicina, adsorvidos a partículas de carbono activado (Hagiwara e Takahashi, 1987). Espera-se com esta atitude terapêutica que, uma vez introduzidas na cavidade pleural, estas partículas sejam drenadas pelas vias linfáticas que acabámos de descrever e se venham a depositar nas estruturas ganglionares

do mediastino onde, por acção da digestão feita por macrófagos existentes nos gânglios possam libertar as substâncias que transportam, atingindo localmente concentrações eficazes do agente terapêutico, sem que se verifiquem os efeitos colaterais destas drogas, sempre temíveis, nos tecidos e circulação periféricos. Embora ainda em fase experimental de estudo estas novas abordagens terapêuticas têm dado resultados promissores, mensuráveis nomeadamente através da redução do tamanho das metástases ganglionares durante o período pré-operatório. Em nosso entender, estudos como aquele que desenvolvemos são fundamentais para conhecer a distribuição, o mais exacta possível das substâncias introduzidas na cavidade pleural, tendo em vista o objectivo de fazer uma correcta escolha do local de aplicação da droga bem como da selecção de drogas com biodisponibilidade adequada ao efeito pretendido. Exemplificando, se se pretende uma redução de metástases de carcinoma brônquico que se encontram localizadas nos gânglios intertraqueobronquicos ter-se-á que utilizar drogas que sejam eficazes pelo menos 7 dias após a introdução na cavidade pleural, pois só nesta altura as partículas atingirão concentrações significativas nestes gânglios.

6.8 Manchas Leitosas

As manchas leitosas da pleura foram descritas pela primeira vez por von Recklinghausen como "milchflecke" em 1863 nas cavidades peritoneal e pleural de coelhos jovens. A sua presença noutros animais foi referida por Maximow em 1927 e por Mixter em 1941, que estendeu as suas observações ao Homem onde também encontrou estas estruturas. A capacidade fagocítica das manchas leitosas, suspeitada com base numa composição celular maioritariamente macrofágica, foi postulada pela primeira vez por Marchand em 1901 e posteriormente confirmada (Figura 6.5) por numerosos outros estudos em que incluímos os nossos (Pereira e Grande, 1992). Apesar de conhecidos e estudados em várias espécies animais só em 1949 lhes seria atribuída importância em termos fisiopatológicos (Cooray,

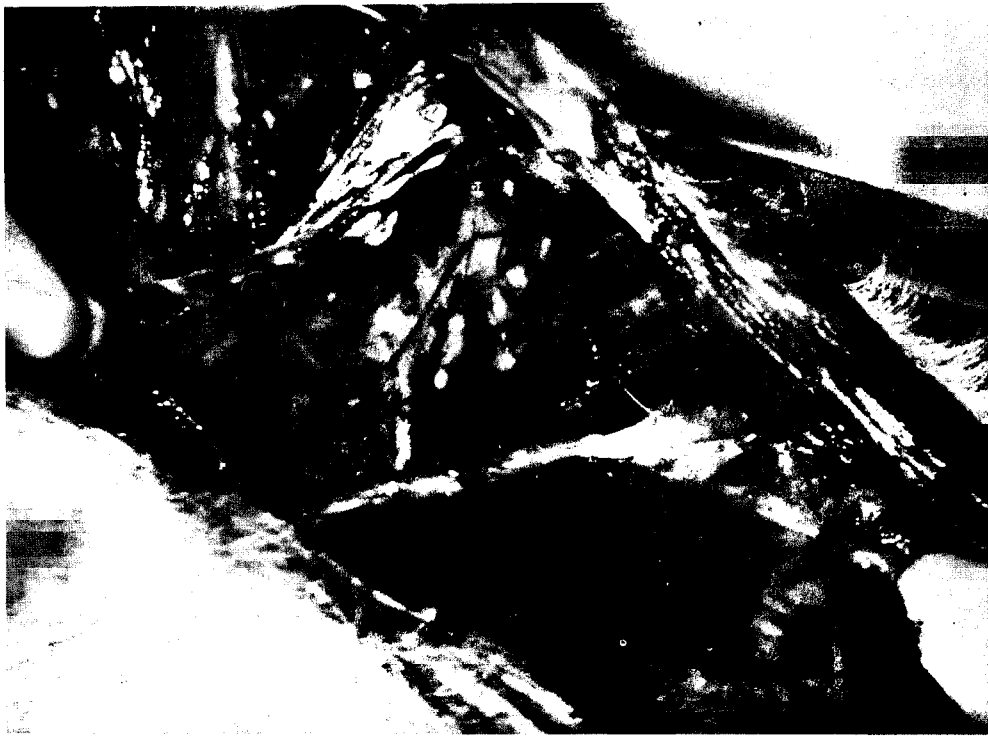


Fig. 6.5 - Prega pleural retrocardiaco-reatrística de cão injectado com CaWO_4 na cavidade pleural 3 dias antes do sacrifício. São visíveis numerosas manchas leitosas contendo inclusões de tungstato de cálcio.

1949). Para este autor seriam as manchas leitosas da pleura as responsáveis pela baixa incidência de mediastinites que observou em séries de autópsias quando comparadas com a elevada frequência de patologia pleuro-pulmonar. Na sequência de um trabalho de investigação em que vários agentes patogénicos foram introduzidos na cavidade pleural do rato, Cooray (1949), conclui que as manchas leitosas da pleura seriam estruturas de defesa do mediastino. Recentemente vários autores se tem dedicado à anatomofisiologia das manchas leitosas, em particular daquelas existentes na cavidade peritoneal. Nesta serosa as manchas leitosas estão localizadas preferencialmente no grande epíplon e, de acordo com Shimotsuma (1989), no Homem, o seu número decresce acentuadamente com a idade variando de 44/cm² aos 7 meses de idade até 1,7/cm² aos 78 anos. Este decréscimo no número de milky spots presentes no grande epíplon é no entanto mais acentuado nos primeiros dois anos de vida, em que há uma redução de cerca de 50% (cerca de 20 milky spots por cm² são encontrados aos dois anos de idade). Quanto às manchas leitosas da cavidade pleural não existem estudos quantitativos. Nas amostras por nós estudadas obtidas

quer ao cão quer ao rato também observamos uma redução com a idade do número de manchas leitosas por unidade de área pleural.

A composição celular destes corpúsculos tem sido também estudada, principalmente nos últimos anos e em particular a das manchas leitosas do peritoneu. No grande epiplon humano as manchas leitosas são constituídos por macrófagos (47.5%±7.5), linfócitos B (29.1%±5.2) linfócitos T (11.7%±2.4) e mastócitos (6.1%±2.6) (Shimotsuma e col., 1991). Os macrófagos que fazem parte das manchas leitosas tem uma localização preferencialmente submesotelial (Shimotsuma e col., 1990). Na cavidade abdominal Beelen (1980) propôs que os macrófagos peritoneais seriam originados a partir de células das manchas leitosas. A função postulada para as manchas leitosas do peritoneu é a de protecção local e participação na resposta imune contra antigénios que chegam pela via do tubo digestivo. A composição celular destes corpúsculos na pleura apresenta semelhanças com a composição das manchas leitosas do peritoneu, nomeadamente o predomínio de linfócitos B sobre células T (Inoue e Otsuki, 1992). No entanto, em contraste com as manchas leitosas do peritoneu, as manchas leitosas da pleura mostraram uma clara zonação, com localização preferencial de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B CD5+ na basal do corpúsculo e linfócitos Ig M+ dispersos no corpúsculo difusamente mas não na basal. Este tipo de distribuição torna as manchas leitosas da cavidade pleural mais próximas do conceito clássico de MALT proposto por Bienenstock e Befus em 1980. Em nosso entender este tipo de distribuição tem, no entanto, a ver com a capacidade funcional das manchas leitosas nomeadamente com a hipotética capacidade de os plasmócitos contidos no corpúsculo poderem segregar imunoglobulinas para o interior da cavidade pleural.

Com o objectivo de caracterizar a resposta das manchas leitosas da pleura a vários tipos de substâncias com acção conhecida sobre o sistema imune efectuámos uma série de experiências em que essas substâncias eram introduzidas na cavidade pleural por punção torácica. Utilizámos o adjuvante incompleto de Freund (óleo mineral) que causa uma forte reacção inflamatória com uma estimulação não específica da imunidade humoral, o adjuvante

completo de Freund (óleo mineral com micobactérias mortas pelo calor) que causa uma forte reacção inflamatória com estimulação da imunidade de tipo celular e um corticoesteróide (betametasona) que causa uma depressão geral do sistema imune.

Assim retomámos os estudos originais de Cooray (1949) e estudamos as modificações histológicas e citológicas das manchas leitosas pleurais provocadas por substâncias de diferente acção imunomoduladora introduzidas na cavidade pleural. Os nossos resultados documentam que as manchas leitosas são estruturas com grande capacidade plástica e que respondem de forma diferente consoante a natureza do estímulo a que são sujeitas (Capítulo 5). Contrariamente ao defendido por alguns autores (Koten e Otter, 1991) não encontramos nas manchas leitosas pleurais arranjos em zonação característica dos órgãos linfóides organizados, havendo sim zonas em que são predominantes determinados tipos celulares. As manchas leitosas da pleura apresentavam características histológicas consistentes com uma potente resposta imune de tipo humoral após injeção de adjuvante incompleto de Freund e com uma potente reacção de natureza celular após injeção de adjuvante completo de Freund. Com base nestas características reaccionais é pois, correcto aceitar que estas estruturas tenham um papel importante na defesa do mediastino contra agressões oriundas do espaço pleural. Dado não existirem diferenças significativas entre as manchas leitosas da pleura e do peritoneu propomos que a designação de OALT ("omentum associated lymphoid tissue") sugerida por Beelen e Col. em 1991 seja alterada para SALT ("serosal associated lymphoid tissue") de modo a incluir as manchas leitosas de ambas as cavidades serosas.

7

**IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E
PERSPECTIVAS FUTURAS**

Aplicações clinicoterapêuticas do conhecimento da cinética e vias da depuração pleural de partículas.

Com o objectivo de conseguir uma elevada eficácia terapêutica com uma reduzida incidência de efeitos colaterais têm vindo a ser desenvolvidas novas formulações galénicas para o tratamento do cancro do pulmão. Assim em 1978 foi referida a injeção de citostáticos adsorvidos a partículas de carbono. (Hagiwara et al.) no tratamento de vários tipos de tumores e, desde então, este tipo de preparações tem sido usado com os mais variados tipos de drogas anticancerosas. Uma das drogas que apresenta claras vantagens em ser usada adsorvida em partículas de carbono é a Bleomicina (Hagiwara and Takahashi, 1987) dado que com esta formulação se obtêm concentrações estáveis do citostático durante longos períodos de tempo o que evita a recuperação da viabilidade celular após lesão potencialmente letal, o que acontece quando se usa esta droga em bolus intermitentes (Takabe et al. 1974; Twentyman and Bleehen, 1975). Estudos preliminares com Bleomicina e/ou Pepleomicina adsorvidas a partículas de carvão activado, administradas intratraquealmente, demonstraram uma elevada actividade residual no parênquima pulmonar bem como nos gânglios linfáticos do mediastino, sendo de pressupor uma distribuição das partículas de carvão activado nestes ganglios idêntica á verificada quando nós instilamos tungstato de calcio intrabronquialmente (Grande et al., 1990). Os escassos estudos experimentais com modelos animais usando este tipo de formulações reportam-se à sua acção terapêutica em ratinhos inoculados com células B-16 de melanoma de rato; estes estudos indicam uma elevada eficácia terapeutica que tem no entanto de ser melhor caracterizada (Ekimoto et al. 1982). A administração intrabrônquica e intrapleural em humanos revelou tambem resultados encorajadores (Nakabayashi et al. 1982, 1984). Foi tambem observado que o carvão activado tem uma elevada apetência pela superficie celular das células neoplásicas às quais adere (Hagiwara and Takahashi, 1987). Uma vez depuradas da árvore respiratória as partículas de carvão activado distribuem-se nos gânglios satélites, particularmente nas áreas onde se encontram lesões micro-metastáticas,

o que pode representar uma vantagem terapêutica adicional (Takahashi et al. 1983). Neste contexto, é importante caracterizar experimentalmente a depuração pleuropulmonar deste tipo de partículas, em particular a cinética e vias de drenagem em função do tamanho das partículas utilizadas. O uso de modelos animais no estudo da depuração pleural de partículas, como é o caso do modelo por nós ensaiado, torna-se um excelente auxiliar experimental na definição correcta de novos ensaios terapêuticos do cancro do pulmão humano. Este objectivo torna-se mais importante ainda quando se sabe que no nosso país o carcinoma do pulmão é um tumor com elevada incidência e prevalência.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Utilização dos Ratinhos nu/nu-META/Bom como Modelo para o Estudo da Biologia de Tumores Humanos Xenotransplantados. Pretendemos estudar algumas das características fundamentais do comportamento dos tumores malignos do pulmão após o seu transplante para os ratinhos da estirpe nu/nu-META/Bom, recentemente desenvolvidos como receptores electivos de células tumorais humanas. Assim utilizaremos métodos histológicos, histoquímicos e bioquímicos para estudar o crescimento, a invasão local e metastização dos tumores humanos transplantados.

Avaliação da eficácia terapêutica das formulações em que se usam citostáticos adsorvidos em partículas de carvão activado no tratamento de diversos tipos de neoplasias primárias ou secundárias da árvore respiratória. Este tipo de terapêutica tem sido referido como dando bons resultados em diversos tipos de tumores e no caso do carcinoma do pulmão em que as terapêuticas convencionais são conhecidas pelos fracos resultados alcançados, a aplicação de citostáticos adsorvidos em partículas de carvão activado parece-nos constituir uma alternativa ou processo de terapia complementar a ser estudado.

Tendo em vista uma correcta programação da terapeutica e escolha das drogas e tamanho das partículas de carvão activado a utilizar, assume primordial importancia o **estudo da depuração pleuropulmonar deste tipo de partículas**, em particular a cinética e vias de drenagem em função do tamanho das partículas utilizadas. A concentração de partículas contendo o citostático nos vários grupos ganglionares torácicos em função da via de administração utilizada terá também de ser conhecida a fim de, em determinado momento, decidir da via de administração (intrabronquica ou intrapleural) mais adequada.

PLANO DE TRABALHOS

1ª fase

Estudo da depuração de partículas de carvão activado introduzidas nos brônquios e no espaço pleural em ratos normais. Serão utilizados diferentes tipos de tamanhos de partículas para determinar o tamanho ideal a ser utilizado.

2ª Fase

Estudo da depuração do tipo de partículas escolhido na primeira fase do trabalho em ratinhos nu/nu Meta/bom com xenotransplantes de tumores humanos. Estudar-se-á a distribuição das partículas de carvão activado nos vários grupos ganglionares em função do tempo e avaliar-se-á a quantidade de citostático em cada um desses grupos utilizando o método do "bioassay". A eficácia dos vários citostáticos será também avaliada por estudo do tamanho das metástases ganglionares e comparação com ratinhos a que se administraram as drogas pelas vias e formulações clássicas.

8

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A análise dos resultados por nós obtidos permitiu tirar várias conclusões das quais se enumeram a seguir as mais importantes. Algumas delas estão em discrepância com o que era admitido até aqui, o que se deve concertar ao tipo de estudo efectuado, de natureza dinâmica, que é hoje fundamental para uma correcta caracterização do funcionamento do sistema linfático no vivo.

- Os linfáticos da rede subpleural do pulmão não participam de forma activa significativa na depuração do espaço pleural.
- A célula mesotelial que recobre a pleura visceral tem capacidade para absorver partículas presentes no espaço pleural: estas partículas aparecem depois nos tecidos subpleurais e no interior do parênquima pulmonar.
- O verdadeiro grupo ganglionar satélite do espaço pleural é o paraesternal, sendo os linfáticos da pleura que recobre a grade costal os principais intervenientes na depuração do espaço pleural.
- As manchas leitosas são estruturas imunocompetentes com um papel primordial na defesa do mediastino contra agressões que lhe cheguem via espaço pleural.

9

SUMMARY

SUMMARY

The pleural cavity can be defined as the space located between the visceral and the parietal leaflets of the pleura. The clearance of particles that reach this serosal space was generally considered to be made through the parietal leaflet. Our experimental work has disproved this view: we found, by using calcium tungstate as the particle marker introduced in the pleural cavity, that the visceral leaflet of the pleura also participates in the clearing process of the pleural space. Also in contradiction with prevalent concepts, we demonstrated that mesothelial cells have important phagocytotic abilities which were expressed by the ingestion of large number of calcium tungstate particles.

The new information obtained in our experiments has important consequences on basic concepts of the pathophysiology of pleura and lung. For instance, our observations will favor the possibility of infectious agents and malignant cells, that are initially located in the pleural space, to disseminate into the lung parenchyma across the visceral leaflet of the pleura.

The visceral leaflet of the pleura has a dual arterial circulation arising both from the pulmonary and bronchial arteries. This recent knowledge has changed our concepts about the clearance of particles from the pleural space and, in accordance with this change, we have reinvestigated the clearance of particles of calcium tungstate from the pleural space into thoracic lymph nodes.

We have also characterized the involvement of the different thoracic lymph node groups in the process of clearance of the pleural space of the dog. Our data allowed the definition of a kinetical mapping of the sorting of the particles into the different lymph nodes. We established that the parasternal lymph nodal subgroup is the major satellite group of the pleural space. In this lymph node group the peak of tungsten deposition was observed at day 3. Between day 3 and day 7 the deposition of tungsten particles decreased in the parasternal group and increased in the other

thoracic nodal groups. This suggests that the particles were distributed from the parasternal lymph nodal subgroup into other thoracic lymph node groups. The data allowed us to conclude that the lymphatic components present in association with the costal pleura are the ones that have a more active participation in the clearance of the pleural space.

We found a massive deposition of tungsten particles in the milky spots located in the retrocardiac pleural folds of dogs and rats. This accumulation was detected as early as 24 hours after the intrapleural instillation of the tungsten powder, thus suggesting that the milky spots were important participants in the clearance of the pleural space. To further investigate the role of milky spots in the local defense of the pleural space we have studied the response of these lymphoepithelial structures to the injection of well defined immunomodulatory substances into the pleural cavity. We have used incomplete Freund's adjuvant (mineral oil), complete Freund's adjuvant (mineral oil + killed mycobacteria) and a corticoesteroid. The structural features that we have observed in the reactive milky spots indicate they are able of mounting both a strong humoral (as in IFA-treated rats) or cellular (as in CFA-treated rats) immune response. These results show that milky spots are fully capable lymphoepithelioid organs that react according to the immunological nature of the stimuli present in the pleural space. This role of milky spots may therefore protect the mediastinum against agents coming from the pleural space.

10

BIBLIOGRAFIA

- Aharinejad S, Franz P, Firbas W.** The milky spots on the chest wall of newborns. *Acta Anat* 138:341-347, 1990
- Albertine KH, Wiener-Kronish JP, Roos PJ, Staub NC.** Structure, blood supply, and lymphatic vessels of the sheep's visceral pleura. *Amer J Anat* 165:277-294, 1982
- Andrews PM, Porter KR.** The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvili. *Anat Rec* 177:409-426, 1973
- Antony VB, Sahn SA, Mossman B, Gail DB, Kalica A.** Pleural cell biology in health and disease. *Am Rev Respir Dis* 145:1236-1239
- Astoul P, Boutin C, Seitz B.** Diagnostic des pleurésies. *Rev Prat (Paris)* 40:1829-1836, 1990
- Baradi AF, Hope J.** Observations on ultrastructure of rabbit mesothelium. *Exp Cell Res* 34:33-44, 1964
- Bartoszewicz W, Dux K.** Electron microscopic examinations of omental milky spots of normal mice. *Nowotwory* 18 :225-230, 1968
- Beelen RHJ.** Role of omental milky spots in the local immune response. *Lancet* 339:689, 1992
- Beelen RHJ.** The greater omentum: physiology and immunological concepts. *Neth J Surg* 43:145-149, 1991
- Beelen RHJ, Fluitsma DM, Hoefsmit ECM.** The cellular composition of omental milky spots and the ultrastructure of milky spot macrophages and reticulum cells. *J Reticuloendothelial Soc* 28: 585-599, 1980
- Bienenstock J, Befus AD.** Mucosal immunology. *Immunology* 41:249-270, 1980

Black LF. The pleural space and pleural fluid. *Mayo Clinic Proc* 47:493-506, 1972

Brandt A, Schnorr B. Blutgefassversorgung des grossen netzes von schaf und ziege. *Z Mikrosk Anat Forsch* 97:427-440, 1983

Caplan I. Anatomical review of the lymph nodes of the human mediastinum. *Surg Radiol Anat* 12:9-18, 1990

Caplan I. Revision anatomique des centres ganglionnaires lymphatiques du mediastinum antérieur. *Bull. Assoc Anat* 71:32, 1987

Cooray GH. Defensive mechanisms in the mediastinum with special reference to the mechanics of pleural absorption. *J Path Bact* 61:551-567, 1949

Cotran RS, Karnovsky MJ. Ultrastructural studies on the permeability of the mesothelium to horseradish peroxidase. *J Cell Biol* 37:123-137, 1968

Courtice FC, Morris B. The effect of diaphragmatic movement on the absorption of protein and red cells from the pleural cavity. *Aust J Exp Biol Med Sci* 31:227-238, 1953

Courtice FC, Simmonds WJ. Absorption of fluids from the pleural cavities of rabbits and cats. *J Physiol* 109:117-130, 1949

Courtice FC, Simmonds WJ. Physiological significance of lymph drainage of the serous cavities and lungs. *Physiol Rev* 34:419-448, 1954

Cugell WC. The hard metal diseases. *Clinics Chest Med* 13:269-279, 1992

Dandy WE, Rowntree LG. Peritoneal and pleural absorption with reference to postural treatment. *Annals Surg* 65:587-596, 1914

Delahant AB. An experimental study of the effects of rare metals on animal lungs. *AMA Arch Ind Health* 12:116-120, 1955

- Dybkowsky.** Uber aufsaugung und absonderung der pleurawand. Berichte uber die verhandlung der koniglichen sachsichen gessellschaft der wissenschaften zu leipzig. Mathematische-Physische Klasse 18:191-218, 1866
- Ekimoto H, Yamashita T, Takahashi K, Matsuda A, Nagahama F.** Therapeutic effects of anticancer agent (pepleomycin) adsorbed on activated charcoal to pulmonary growth of intratracheally implanted tumor in mice. Jpn J Cancer Chemotherapy 9:1380-1386, 1982
- Grande NR, Ribeiro J, Soares M, Carvalho E.** The lymphatic vessels of the lung: morphological study. Acta Anat 115: 302-309, 1983
- Grande NR, Sá CM, Águas AP.** Time course and distribution of tungsten laden macrophages in the hilar lymph nodes of the dog lung after experimental instillation of calcium tungstate into the left apical bronchus. Lymphology 23:171-182, 1990
- Gray SW, Skandalakis JE.** Embryology for Surgeons. Philadelphia, W.B. Saunders, 1972
- Gray SW, Skandalakis JE.** Development of the pleura. In: "The pleura in health and disease". Ed Chrétien J, Bignon J, Hirsch A. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel :3-19, 1985
- Hagiwara A, Takahashi T.** A new drug delivery system of anticancer agents: activated carbon particles adsorbing anticancer agents. In Vivo 1:241-252, 1987
- Harding HE.** Notes on the toxicology of cobalt metal. Br J Ind Med 7:76-78, 1950
- Hayek H.** Das fettgewebe der pleura; in Hayek H eds: Die mensliche Lunge. Berlin, Springer, pp 38-43, 1970
- Hirsch A, Bernaudin JF, Nebut M, Soler P, Cagnet J.** Le mesothelium pleural: structure et fonctions. Bull Eur Physiopathol Respir 12:387-406, 1976

Hodel C. Ultrastructural studies on the absorption of protein markers by the greater omentum. *Eur Surg Res* 2:435-449, 1970

Hovelacque A. Anatomie macroscopique des lymphatiques du poumon vaisseaux et ganglions. Etude faite sur le foetus et le nouveau-né. *Bibliographie Anat* 22:265-308, 1912

Inoue N, Otsuki Y. Lymphocyte subpopulations in mediastinal milky spots of mice: light and electron microscopic immunohistochemical observations. *Arch Histol Cytol* 55:89-96, 1992

Johnston RF, Dohnarsky JH. Pleural diseases. In: "Pulmonary diseases and disorders". Ed Fishman AP. McGraw-Hill Book Company, New York:1357-1380, 1980

Kampmeier OF. Concerning certain mesothelial thickenings and vascular plexuses of the mediastinal pleura, associated with histiocyte and fat-cell production, in the human newborn. *Anat Rec* 39:201-213, 1928

Kanazawa K. Exchanges through the pleura. In: "The pleura in health and disease". Ed Chrétien J, Bignon J, Hirsch A. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel :195-231, 1985

Kanazawa K, Roe FJC, Yamamoto T. Milky spots (*Taches laiteuses*) as structures which trap asbestos in mesothelial layers and their significance in the pathogenesis of mesothelial neoplasia. *Int J Cancer* 23:858-865, 1979

Kaplun ZS, Mezencewa NW. Experimental study on the toxic effect of dust in production of sintered metals. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 4:390-394, 1960

Kim KJ, Critz AM, Crandall ED. Transport of water and solutes across sheep visceral pleura. *Am Rev Respir Dis* 120:883-892, 1979

Kinasewitz GT, Fishman AP. Pleural dynamics and effusions. In: "Pulmonary diseases and disorders". Ed Fishman AP. McGraw-Hill Book Company, New York:2117-2138, 1988

- Koerten HK, Brederoo P, Ginsel LA, Daems WT.** The endocytosis of asbestos by mouse peritoneal macrophages and its long term effect on iron accumulation and labyrinth formation. *Eur J Cell Biol* 40:25-36, 1986
- Kotani M.** The lymphatics and lymphoreticular tissues in relation to the action of sex hormones. *Arch Histol Cytol* 53:1-76, 1990
- Koten JW, Otter WD.** Are omental milky spots an intestinal thymus?. *Lancet* 338:1189-1190, 1991
- Lai-Fook SJ.** Mechanics of the pleural space: Fundamental concepts. *Lung* 169:S185-S203, 1991
- Lang J.** Ueber eigenartige kapillarkonvolute der pleura parietalis. I. *Z. Zellforsch* 58:487-523, 1962
- Lang J.** Ueber die gefasse und die zellen der milchflecken. *Z. Zellforsch* 66:1-27, 1965
- Legrand M, Pariente R, Andre J.** Ultrastructure de la pleure parietale humaine. *Presse Med* 55:2515-2520, 1971
- Marchand F.** Ueber clasmatozyten, mastzellen und phagozyten des netzes. *Verh Dtsch Pathol Ges* 4:124-131, 1901
- Mariassy AT, Wheeldon EB.** The pleura: a combined light microscopic, scanning and transmission electron microscopic study in the sheep. I. Normal pleura. *Exp Lung Res* 4:293-313, 1983
- Maximow A.** Ueber das mesothel (deckzellen der serosen haute) und die zellen der serosen exsudate. Untersuchungen an entzundetem gewebe und an gewebskulturen. *Arch Exp Zellforsch* 4:1-42, 1927
- McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO.** Subgross pulmonary anatomy in various mammals and man. *JAMA* 175:694-697, 1961

Mironov VA, Gusev SA, Baradi AF. Mesothelial stomata overlying omental milky spots: scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res* 201:327-330, 1979

Miserocchi G, Pistolesi M, Miniati M e al. Pleural liquid pressure gradients and intrapleural distribution of injected bolus. *J Appl Physiol Respir Environ Exercise Physiol* 56:526-532, 1984

Mixter RL. On macrophageal foci ("milky spots") in the pleura of different mammals including man. *Amer J Anat* 69:159-186, 1941

Munka V, Gregor A, Durovicova J. The topography and tributary areas of the bronchopulmonary lymph nodes of left lungs. *Folia Morphol* 20:201-203, 1972

Nagaishi C. Lymphatic system. In: "Functional anatomy and histology of the lung". Ed Nagaishi C, Nagasawa N, Yamashita M, Okada Y, Inaba N. University Park Press. Baltimore, London:102-179, 1972

Nakabayashi T, Koroku T, Saito T, Yasuda S, Yamashiro K, Taneda M, Miakawa A, Nagahama F. Endobronchial infusion of pepleomycin adsorbed in charcoal (Pep-Ac) by flexible bronchofibercospy in lung cancer. *J Jpn Soc Bronch* 6:329-335, 1984

Nakabayashi T, Saito T, Koroku T, Yasuda S, Nagahama F, Ekimoto H, Yamashita Y, Matsuda A. Local treatment of lung cancer with pepleomycin adsorbed in charcoal (Pep-Ac). *Proceedings of IIIrd World Conference on Lung Cancer*:132, 1982

Nakamura T, Tanaka Y, Fukabori T, Iwasaki Y, Nakagawa M, Kira S. The role of lymphatics in removing pleural liquid in discrete hydrothorax. *Eur Respir J* 1:826-831, 1988

Nose Z. Das lymphgefasssystem der krote, insbesondere seine zirkulationsanordnung. *Okagimas Fol Anat Jap* 9:371-428, 1931

- Odor DL.** Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscopes. *Amer J Anat* 95:433-466, 1954
- Parkes WR.** Occupational lung disorders. Boston. Butterworths, 464-466, 1982
- Peão MND, Águas AP, Grande NR.** Cellular kinetics of inflammation in the pleural space of mice in response to the injection of exogeneous particles. *Exp Lung Res* 18:863-876, 1992
- Penell TC, Salem W.** Anatomical study of the peripheral pulmonary lymphatics. *J Thorac Cardiovasc Surg* 52:629-634, 1966
- Pereira AS, Grande NR, Carvalho E, Ribeiro A.** Evidence of drainage of tungsten particles introduced in the pleural space through the visceral pleura into the lung parenchyma. *Acta Anatomica* 145:416-419, 1992
- Pinchon MC, Bernaudin JF, Bignon J.** Pleural permeability in the rat. II. Immunochemical demonstration of serum proteins in pleural structures. *Biol Cell* 42:29-34, 1981
- Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C.** Pleural liquid and solute exchange - state of the art. *Am Rev Respir Dis* 140:825-847, 1989
- Ranvier L.** Recherches sur la formation des mailles du grand epiploon. *Arch Physiol Norm Pathol* 6:421-428, 1874
- Riquet M, Hidden G, Debesse B.** Direct lymphatic drainage of lung segments to the mediastinal nodes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 97:623-632, 1989
- Shimotsuma M, Simpson-Morgan M.** Omental milky spots. *Lancet* 338:1596, 1991
- Shimotsuma M, Takahashi T, Kawata M, Dux K.** Cellular subset of the milky spots in the human greater omentum. *Cell Tissue Res* 264:599-601, 1991

Shimotsuma M, Kawata M, Hagiwara A, Takahashi T. Milky spots in the human greater omentum. macroscopic and histological identification. *Acta Anat* 136:211-216, 1989

Shimotsuma M, Hagiwara A, Takahashi T, Kawata M, Shields JW. Surface structure and cell zonation in human omental milky spots. *Lymphology* 23:207-208, 1990

Starling EH, Tubby AH. On absorption from and secretion into the serous cavities. *J Physiol* 16:140-155, 1894

Stoebner P, Miech G, Sengel A. Notions d'ultrastructure pleurale. I. L'hyperplasie mésotheliale. *Presse Med* 78:1179-1184, 1970

Takabe Y, Watanabe M, Myiamoto T, Terasima T. Demonstration of repair of potential lethal damage in plateau phase cells of Ehrlich ascites tumour after exposure to bleomycine. *Jpn J Cancer Res* 65:559-560, 1974

Takahashi R, Hagiwara A. Endoscopic chemotherapy for lymphnodal metastases of gastric cancer. *Em: Endoscope and chemotherapy for gastric cancer.* Eds. Okabe H, Kurihara M. Tokyo, Kani-shobo, pp 129-142, 1983

Trapnell DH. The peripheral lymphatics of the lung. *Brit Radiol* 36:660-672, 1963

Twentyman RR, Bleehen NM. Studies of potentially lethal damage in EMT6 mouse tumor cells treated with bleomycine either in vitro or in vivo. *Brit J Cancer* 32:491-501, 1975

Von Recklinghausen F. Zur fettresorption. *Arch Pathol Anatomie Physiol und Klin Med* 26:172-208, 1863

Von Recklinghausen F. Uber eiter bindegewebskorperchen. *Virchows Arch Pathol Anat* 28:157-166, 1863

Wang N-S. Anatomy and physiology of the pleural space. *Clinics Chest Med* 6(1):3-18, 1985

Wang NS. The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Amer Rev Respir Dis* 110:623-633, 1974

Wang NS. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parital pleura. *Amer Rev Respir Dis* 111:12-20, 1975

G. Carter
3. 50062
43. 11. 18

BIBLIOTECA
DO
INSTITUTO DE CÉRCOS BIOMÉDICAS
"ABDOLLAZAR"