

Demonstração de um protocolo para o estudo anatomopatológico dos vasos linfáticos no linfedema

Demonstration protocol for the anatomic-pathologic study of lymphatic vessels in lymphedema

Claudia Stein Gomes¹, Fernando Silveira Picheth¹, Ezio Fulcheri²,
Corradino Campisi³, Francesco Boccardo³

Resumo

Objetivo: Sugerir um protocolo de estudo dos vasos linfáticos com o propósito de obter os dados necessários para uma melhor compreensão da morfologia e das alterações parafisiológicas e francamente patológicas do círculo linfático na patologia do linfedema, tanto de origem primária como secundária.

Métodos: A primeira etapa do protocolo é a obtenção do material, que pode ser um grupo de tecido fibroadiposo, em que estão envolvidos os vasos linfáticos, ou um segmento isolado de coletor linfático. Após, segue-se uma série de etapas: fixação e inclusão do material, preparação de 11 lâminas com colorações histoquímicas e imuno-histoquímicas e, por último, leitura das lâminas em busca de alterações, desde os componentes dos vasos linfáticos até a matriz periadventicial.

Resultados: Conforme o grupo de células predominante na parede do vaso e na matriz periadventicial, pode-se suspeitar de uma reação actínica, como, por exemplo, nos casos em que há muita fibrose e regressão das fibras contráteis ou, ainda, no caso de um linfedema crônico pós-cirúrgico, quando há predominância de um processo degenerativo da parede linfática.

Conclusão: Para a realização de um estudo amplo dos vasos linfáticos em diversos laboratórios de anatomia patológica, faz-se necessária a criação de um protocolo para melhor compreensão desta patologia tão complexa.

Palavras-chave: linfedema, imunohistoquímica, histologia.

Abstract

Objective: To suggest a study protocol for lymphatic vessels in order to obtain the data necessary to better understand their morphology and paraphysiological alterations, as well as any clearly pathological manifestations of the lymphatic circle in the pathology of lymphedema, both of primary and secondary origin.

Methods: The protocol begins with a material sample, which can be taken from the fibrous-fatty tissue surrounding the lymphatic vessels or from an isolated lymphatic collector. Afterwards, a series of steps are followed, including the fixation and inclusion of the material, the preparation of 11 slides with different histochemical and immunohistochemical colorations, and finally, the reading of the slides in search of alterations ranging from the lymphatic vessel components to the periadventitial matrix.

Results: According to the prevailing cell group on the vessel walls and the periadventitial matrix, an actinic reaction can be suspected, such as, for example, in cases where there is excessive fibrosis and regression of contractile fibers, or even in the case of a post-surgical chronic lymphedema when there is evidence of a degenerative process of the lymph walls.

Conclusion: The creation of a protocol that provides a better understanding of such a complex pathology is necessary in order to perform an encompassing study of the lymphatic vessels in different pathological anatomy laboratories.

Key words: lymphedema, immunohistochemistry, histology.

1. Serviço de Angiologia e Cirurgia Vascular, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Curitiba – PUCPR, Curitiba, PR.
2. Instituto de Anatomia Patológica, Hospital São Martino, Universidade de Gênova, Itália.
3. Departamento de Cirurgia (DISCAT), Seção de Clínica Cirúrgica de Urgência, Centro de Linfologia e Microcirurgia, Hospital São Martino, Universidade de Gênova, Itália.

Artigo submetido em 29.04.03, aceito em 29.09.03.

O linfedema é uma patologia caracterizada por um aumento de volume dos tecidos moles na região acometida, que pode evoluir para quadros de grandes deformidades, como nos casos de elefantíase. Sua causa deve-se a uma deficiência no transporte da linfa através dos vasos linfáticos por etiologia primária (congenita ou idiopática) ou secundária a processos inflamatórios, infecciosos, terapêutica com irradiação ou cirurgia. O

linfedema acomete um grande número de pacientes, principalmente após intervenções oncológicas ou após processos inflamatórios e/ou infecciosos.

O tratamento dessa patologia inclui métodos de drenagem linfática manual, pressoterapia e contensão elástica. Já o tratamento cirúrgico varia desde técnicas dermodemolitivas até um tratamento mais minucioso, com técnicas microcirúrgicas de anastomose linfático-venosa entre coletores linfáticos e uma veia competente com o auxílio do microscópio operatório¹.

Por meio da microcirurgia, realizada a nível inguinal para membros inferiores e a nível braquial para membros superiores, onde encontram-se coletores linfáticos pré e pós-linfonodais de calibres entre 0,5 a 1 mm, tornou-se possível a realização de estudos anatomopatológicos em tecidos perilinfáticos e linfonodais provenientes do ato operatório. Normalmente, são reconhecidas e descritas algumas lesões histopatológicas dos vasos linfáticos², que constituem a base dos diferentes quadros do linfedema. Tratam-se de algumas modificações involutivas e distróficas dos vasos, genericamente catalogadas como fibrose da parede vascular e aumento da matriz periadventicial, interpretadas como sinais indiretos e seqüelas da reação inflamatória aguda ou crônica. Essas lesões, todavia, não justificam a base patológica dos diferentes quadros nem tampouco explicam os quadros clínicos polimorfos ou indefinidos.

Os vasos linfáticos são essencialmente compostos por um endotélio com seu aparato valvular, por uma parede geralmente sutil e pela adventícia. A parede do vaso é formada por uma camada profunda da íntima e uma camada média, que compreendem uma parte celular (fibroblastos e células musculares lisas) e uma parte não-celular (fibras elásticas, colágeno e proteoglicanas). Na camada adventícia, encontram-se as *vasa-vasorum*. Todos os componentes dos vasos linfáticos estão envolvidos por uma matriz perivasal e são responsáveis basicamente pela condução da linfa.

O estudo anatomopatológico dos vasos linfáticos não é fácil de ser realizado visto que essas estruturas têm pequeno calibre. Com as colorações histológicas comuns, como a hematoxilina-eosina, pode-se somente observar as alterações fibroescleróticas das paredes dos vasos, quantificar o componente da matriz periadventicial e pesquisar os elementos da reação inflamatória. Sob esse ponto de vista, o estudo é puramente morfológico. Além disso, é necessário o uso de corantes específicos para conseguir identificá-los e diferenciá-los dos vasos sanguíneos. O endotélio dos vasos linfáticos não

produz uma quantidade suficiente do fator VIII da coagulação para ser avaliado em uma seção histológica com os métodos imuno-histoquímicos³. Somente após uma adequada lise com enzimas proteolíticas (colagenase ou tripsina) é possível desmascarar os sítios antigênicos e evidenciar o fator VIII também no endotélio dos vasos linfáticos.

O objetivo deste estudo é sugerir um protocolo para o estudo dos vasos linfáticos a fim de que se possa obter os dados necessários para uma maior compreensão da morfologia e das alterações para fisiológicas (compensadoras) ou francamente patológicas (alterações degenerativas) do círculo linfático na patologia do linfedema, tanto de origem primária como secundária.

Para a compreensão da patologia do sistema vascular linfático, é, portanto, importante poder passar de um estudo morfológico a uma análise morfofuncional, que seja capaz de colocar em evidência as características funcionais da parede dos vasos em termos de capacidade contrátil residual ou de reação hipertrófica e hiperplástica dos componentes dos músculos lisos.

Método

Obtenção do material

O material obtido da intervenção cirúrgica pode ser de dois tipos: um segmento isolado de coletor linfático ou um grupo de tecido fibroadiposo onde estão inclusos os vasos linfáticos. O material deve chegar fresco, no menor tempo possível, ao laboratório de anatomia patológica e, se possível, marcado com um fio cirúrgico em uma de suas extremidades para orientação no seu estudo. O patologista deve mantê-lo em formalina neutra tamponada⁴ e evitar a coaptação e a distorção dos vasos linfáticos.

Fixação

A fixação deve ser breve, não superior a 12 horas, para evitar que haja lesão dos sítios antigênicos.

Inclusão

Quando se trata de uma peça com tecido fibroadiposo e vasos linfáticos, a inclusão deve ser realizada em parafina, após o material ser preparado com cortes em sessões macroscópicas.

Quando se trata de um segmento de coletor linfático, deve-se mantê-lo reto e prepará-lo em ágar⁵ durante a passagem para sua inclusão em parafina.

Preparação das lâminas

Rotineiramente, são preparadas 11 lâminas, coradas da seguinte forma:

- Primeira lâmina: coloração com hematoxilina-eosina;
- Segunda lâmina: coloração tricrômica de Masson;
- Terceira lâmina: impregnação com prata para as fibras reticulares;
- Quarta lâmina: coloração Weigert elástica;
- Quinta lâmina: coloração de Van Gieson;
- Sexta lâmina: coloração imuno-histoquímica com anticorpo primário antiactina músculo liso;
- Sétima lâmina: coloração imuno-histoquímica com anticorpo primário antivimentina;
- Oitava lâmina: coloração imuno-histoquímica com anticorpo primário antidesmina;
- Nona lâmina: coloração com CD 31;
- Décima lâmina: coloração com CD 34;
- Décima primeira lâmina: coloração com hematoxilina-eosina.

Leitura das lâminas

A leitura das lâminas tem como finalidade uma avaliação quantitativa e distributiva das células dos vasos linfáticos e do tecido perilinfático. As primeiras colorações estudadas são a CD 31 e a CD 34 para identificar o vaso linfático.

O endotélio dos vasos hemáticos é corado seletivamente pela coloração imuno-histoquímica com o anticorpo anti-CD 34, enquanto o endotélio dos vasos linfáticos é constantemente negativo para essa coloração. O endotélio dos vasos linfáticos e hemáticos é, no entanto, corado pela coloração imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD 31^{3,6}.

Depois, com a coloração hematoxilina-eosina, avalia-se como é a estrutura morfológica do vaso: diâmetro, espessura da parede, válvulas e matriz periadventicial (Figura 1). Quanto ao lúmen do vaso, este pode estar com calibre reduzido, normal ou aumentado. A parede pode ser sutil, normal, espessada ou fibrótica. O aparato valvular pode estar ausente, ser normal ou proeminente e enfraquecido. E a matriz periadventicial pode estar esboçada, média ou bem evidente (Figura 2). Este algoritmo deve guiar preliminarmente a observação microscópica da seção seriada, permitindo examinar os parâmetros morfológicos de base. Assim sendo, a iden-

tificação dos sinais de flogose, quando presentes nos vasos linfáticos, sugere um linfedema inflamatório^{2,7}.

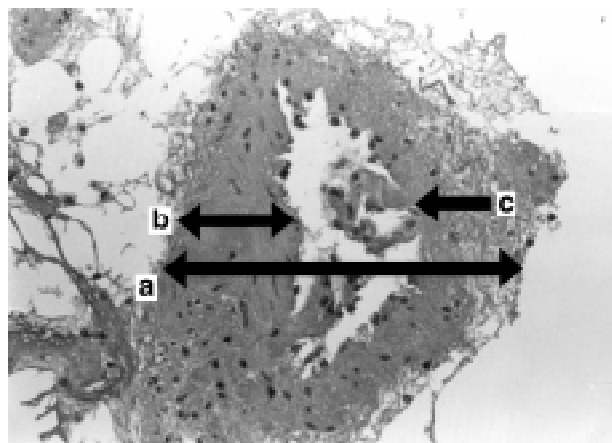


Figura 1 - Corte transversal de um vaso linfático. Após identificação do vaso linfático, avalia-se o diâmetro (a), a espessura da parede (b) e a presença da estrutura valvular (c), conforme setas.

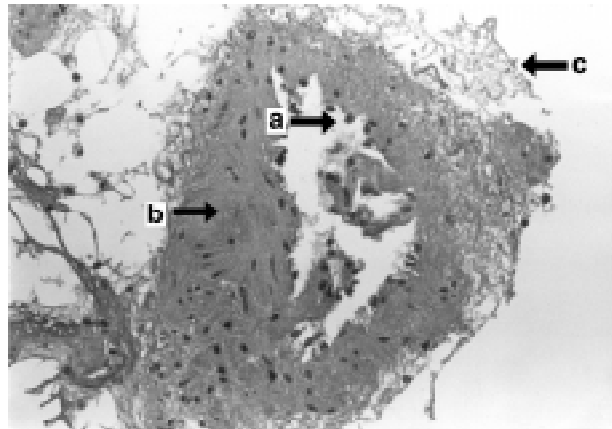


Figura 2 - Corte transversal de um vaso linfático mostrando seu lúmen com as células endoteliais (a), parede com fibras musculares (b) e matriz periadventicial (c), conforme setas.

Por meio da tricromia de Manson, Weigert e Van Gieson, pode-se obter uma avaliação estrutural mais fina dos vasos, com observação dos componentes da matriz intercelular como o colágeno, as fibras elásticas ou as fibras reticulares². Pelas técnicas imuno-histoquímicas, como o método de Avidina Biotina Peroxidase

Complexa (ABC), pode-se, ainda, estudar a parte celular da parede linfática^{2,3,6}. Com o anticorpo primário antivimentina, é possível evidenciar os fibroblastos, fibrócitos e também as células dos músculos lisos. Já com a desmina, coram-se somente os miofibroblastos, e, com a actina músculo liso, coram-se os miofibroblastos e também as células dos músculos lisos da íntima e da túnica média. As células dos músculos lisos presentes na parede dos vasos linfáticos são particularmente observadas na sua quantidade, se média, escassa ou aumentada; na sua distribuição em feixes sutis, se grandes ou fragmentados; e na sua tipologia, se tênue, hipertrófica ou displásica. Assim sendo, conforme o grupo de células predominantes na parede do vaso e na matriz periadventicial, pode-se suspeitar de uma regressão das fibras contráteis, como, por exemplo, nos casos em que há muita fibrose ou, ainda, de um linfedema crônico pós-cirúrgico, em caso de predominância de um processo degenerativo da parede linfática².

Discussão

Na literatura médica, existem poucos trabalhos publicados referentes ao estudo dos vasos linfáticos no linfedema periférico^{2,7-12}, visto que não existem grandes centros de tratamento cirúrgico dessa patologia onde haja um grupo interligado de cirurgiões e laboratórios de anatomia patológica. Junto ao Centro de Linfologia e Microcirurgia da Universidade de Gênova, com a ampla casuística adquirida no tratamento microcirúrgico do linfedema de extremidades por meio das anastomoses linfático-venosas, tornou-se possível o desenvolvimento de grandes estudos do ponto de vista anatomofuncional dos vasos linfáticos, provenientes de biópsias realizadas durante as intervenções cirúrgicas, conforme vários trabalhos publicados por Campisi et al.¹³⁻¹⁸.

Atualmente, há, inclusive, uma classificação proposta pelos patologistas do grupo de pesquisa genovês quanto às alterações linfáticas e linfonodais encontradas nos pacientes com linfedema secundário, que foram submetidos ao tratamento microcirúrgico de anastomose linfático-venosa². Essa classificação foi proposta graças a uma técnica correta, através da qual foi possível expor o diagnóstico baseado tanto na morfologia simples (diâmetro dos vasos linfáticos, presença de fibrose ou sinais inflamatórios) como na morfologia funcional (avaliação da contractilidade e da atividade da parede) dos vasos linfáticos.

Em um futuro próximo, existe a possibilidade da ampliação das pesquisas com um número maior de pacientes clínicos e com amostras retiradas em outros segmentos do membro acometido para que se possa proceder ao estudo minucioso de distintos quadros dessa mesma enfermidade.

Acreditamos que, para a realização de um estudo amplo dos vasos linfáticos em diversos laboratórios de anatomia patológica, faz-se necessária a criação de um protocolo para melhor compreensão dessa patologia tão complexa.

Referências

1. Campisi C, Boccardo F. Linfedemas - Tratamento por técnicas microcirúrgicas. In: Brito CJ, Duque A, Merlo I, Murilo R, Lauria F Fº, editores. Cirurgia Vascul. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p. 1246-77.
2. Dellachà A, Fulcheri E, Boccardo F, Campisi C. Patologie latenti dei vasi linfatici come possibili substrati del linfedema cronico secondario. *Linfologia* 1998;2:20-4.
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular Pathology Technique. 4th ed. Woburn (MA): Butterworth-Heinemann; 1985.
4. Carson F, Martin JK, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* 1973;49:365-73.
5. Ventura L, Bologna M, Ventura T, Colimberti P, Leocata P. Agar specimen orientation technique revisited: a simple and effective method in histopathology. *Ann Diagn Pathol* 2001;5(2):107-9.
6. Lapertosa G, Baracchini P, Fulcheri E, Tanzi R. Small blood vessels or lymphatic channels with neoplastic microemboli: a comparative immunohistochemical study. *Verh Dtsch Ges Path* 1986;70:358-64.
7. Badini A, Fulcheri E, Campisi C, Boccardo F. A new approach in histopathological diagnosis of lymphedema: pathophysiological and therapeutic implications. *Lymphology* 1996;29 Suppl :190-8.
8. Campisi C, Badini A, Boccardo F. Anatomico-pathological bases in the management of primary lymphedema and microsurgical implications. *Lymphology* 1994;27 Suppl: 546-9.
9. Badini A, Fulcheri E. Vantaggi dell'immunoistochimica nella diagnostica istopatologica del linfedema. *Minerva Cardioangiol* 1997;45:17-24.
10. Pfister G, Saesseli B, Hoffmann U, Geiger M, Bollinger A. Diameters of lymphatic capillaries in patients with different forms of primary lymphedema. *Lymphology* 1990;23(3): 140-4.
11. Rada IO, Tudose N, Fedorac R. Fibrosclerosis of tunica media in the prenatal lymphatic vessels of patient with lymphedema. *Morphol Embryol (Bucur)* 1986;32(2):93-7.

12. Kinmonth JB, Wolfe JH. Fibrosis in the lymph nodes in primary lymphoedema. Histological and clinical studies in 74 patients with lower-limb oedema. *Ann R Coll Surg Engl* 1980;62:344-54.
13. Campisi C, Zattoni J, Siani C, et al. Twenty year clinical experience in the microsurgery management of lymphedema. *Lymphology* 1994;27 Suppl :651-7.
14. Campisi C. Lymphatic microsurgery: legend or reality? *Phlebology* 1994;7:11-15.
15. Campisi C. The modern surgery of lymphedema. *Lymphology* 1996;29 Suppl :210-21.
16. Campisi C, Boccardo F. Frontiers in lymphatic microsurgery. *Microsurgery* 1998;18:462-71.
17. Campisi C, Boccardo F. Role of microsurgery in the management of lymphoedema. *Int Angiol* 1999;18(1):47-51.
18. Degni M. New techniques of lymphatic-venous anastomosis for the treatment of lymphedema. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1978;19(6):577-80.

Correspondência:
Dra. Claudia Stein Gomes
Rua Padre Anchieta, 2004/1302
CEP 80730-000 - Curitiba - PR
Tel.: (41) 335.2135 – Fax: (41) 322.9892
E-mail: steingomes@sulbbs.com