

## SÍNDROME DE DUBIN-JOHNSON-SPRINZ

### ESTUDO POR MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

J. O. Soares, M. João Melo e A. Baptista

Serviço de Anatomia Patológica. Hospital de Santa Maria. Lisboa.  
Unidade de Microscopia Electrónica. Faculdade de Medicina de Lisboa.

#### RESUMO

Foi feito estudo histoquímico do tecido hepático em quatro doentes com síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz, um dos quais estudado, também, por microscopia electrónica. Observou-se a presença de granulações intra-hepatocitárias, castanho-escuras, PAS positivas, ácido-resistentes e com grupos redutores, concluindo-se pela presença concomitante de lipofuscina e melanina. Ao microscópio electrónico essas granulações correspondiam à acumulação de material heterogénio e electron-opaco intra-lisossómico, dispondo-se predominantemente na vizinhança do canalículo biliar. É revista a natureza do pigmento característico da afecção, de acordo com publicações recentes de índole morfológica e bioquímica, discutindo-se o síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz como correspondendo a uma doença lisossómica de armazenamento.

Dubin e Johnson descreveram, em 1954, um síndrome anátomo-clínico caracterizado por *uma icterícia crónica com pigmento não identificado na célula hepática* e, correspondente à mesma entidade nosológica referida, em publicação contemporânea, por Sprinz e Nelson (1954) a qual regista *4 casos de icterícia não-hemolítica persistente associada a pigmento lipocrómico nos hepatocitos*.

O síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz é uma hiperbilirrubinémia crónica familiar, caracterizada por um defeito congénito na excreção biliar de substâncias de conjugação na célula hepática (bilirrubina, bromossulfaleína, esteróides, produtos de contraste colecistográfico oral) e, também, de outras substâncias não conjugadas no fígado (rosa de Bengala, verde de indocianina, produtos de contraste biliar intravenoso) (Dubin 1958, Mandema et al 1960, Schoenfield et al 1963, Sherlock et al 1976, Heller et al 1977).

A doença manifesta-se por uma icterícia moderada, que se exacerba por causas várias: infecção, traumatismo, gravidez e fármacos (contraceptivos orais, esteróides anabolizantes) (Cohen et al 1972, Schinella 1972, Seligsohn e Shani 1977). O fígado tem cor negra pela presença de um pigmento intra-hepatocitário semelhante à melanina (Barone et al 1969, Pages e Baldet 1969, Vaughan et al 1970, Arias 1973).

Vários trabalhos têm sido dedicados, desde as descrições originais da doença (Dubin e Johnson 1954, Sprinz e Nelson 1954), ao estudo da natureza do pigmento e do mecanismo da perturbação da função excretora da célula hepática. No presente trabalho apresenta-se um estudo da morfologia do tecido hepático em 4 doentes com síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz, discutindo-se a natureza do pigmento intra-hepatocitário, de acordo com os resultados obtidos e os dados recentes da literatura.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados, sob o ponto de vista morfológico, 4 doentes com diagnóstico de síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz (critérios de Sherlock et al 1976), provenientes do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Maria, Lisboa.

Três doentes eram do sexo masculino e, um, do sexo feminino, estando as idades respectivas, compreendidas entre 18 e 49 anos.

Os fragmentos de fígado foram obtidos por punção-biópsia efectuada com agulha de Menghini. Para microscopia de luz, os fragmentos foram fixados em formol a 10 % e incluídos em parafina. Foram estudados cortes corados com os seguintes métodos: hematoxilina-eosina, PAS, Perls (ferro) Ziehl-Nielsen (lipofuscina), Masson-Fontana (melanina) e Stein (bilirrubina).

Num doente foi processado material de biópsia hepática para estudo em microscopia electrónica. Fragmentos de 1 mm<sup>3</sup> foram fixados em glutaraldeído a 3 % em tampão cacodilato de sódio, pH 7,4, a 4°C, durante 2 horas e, pósfixados em tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato de sódio, pH 7,4, durante 90 minutos. Os fragmentos foram desidratados em álcoois de concentração crescente e incluídos em Epon 812. Cortes de 1 µm foram corados pelo azul de toluidina para selecção da área a observar ao microscópio electrónico. Os cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrótopo LKB III e, diferenciados com acetato de uranilo, durante 20 minutos, e citrato de chumbo, durante 4 minutos, após o que foram observados num microscópio electrónico Philips EM 300, a 80 kV.

## RESULTADOS

*Microscopia de luz*

Em todos os casos estudados a arquitectura lobular hepática estava conservada (Quadro 1). Os espaços-porta não mostravam alterações excepto, em um caso, com ligeiro alargamento e moderada infiltração por células mononucleadas, predominantemente linfócitos.

Quadro 1

*Características histológicas*

Caso	Estrutura	Espaços-porta	Pigmento	C. Kupffer	Alterações associadas
1	conservada	sem alterações	++	sem alterações	—
2	conservada	sem alterações	+++	sem alterações	esteatose
3	conservada	ligeiramente alargados	+++	sem alterações	esteatose
4	conservada	sem alterações	++	hiperplasia	—

Os hepatocitos apresentavam granulações negras (castanho-escuro a preto), com distribuição centrolobular predominante (fig. 1). As granulações eram grosseiras, de dimensões variadas, e dispunham-se sobretudo na vizinhança dos canaliculos biliares.

Os hepatocitos não mostravam outras alterações significativas, excepto ligeira esteatose, em dois dos quatro casos estudados. Num doente havia hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer não mostrando, os restantes três doentes, alterações destes elementos celulares. Em nenhum dos casos foi encontrado pigmento nas células de Kupffer.

O estudo histoquímico revelou, em todas as biópsias, positividade dos grãos citoplasmáticos dos hepatocitos para as colorações de Ziehl-Nielsen e PAS (fig. 2 e fig. 3). Em três dos casos, os grãos coraram pela técnica de Masson-Fontana (fig. 4). Não foi detectada a presença de bilirrubina ou ferro em relação com as granulações do citoplasma das células hepáticas (Quadro 2).

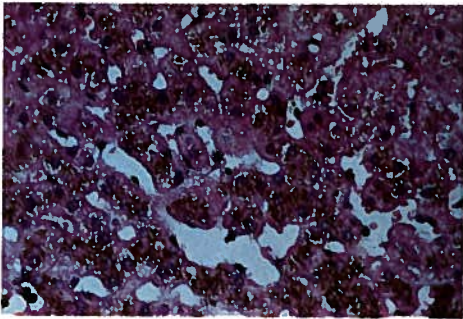


Fig. 1 — Caso 2. Hematoxilina-eosina. x160

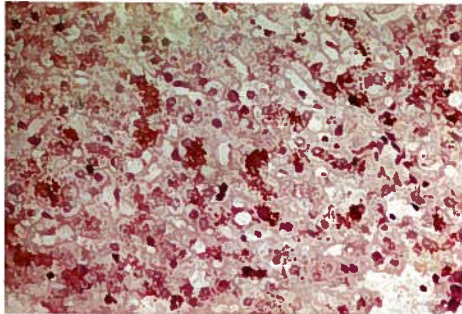


Fig. 2 — Caso 3. Ziehl-Nielsen prolongado. x100

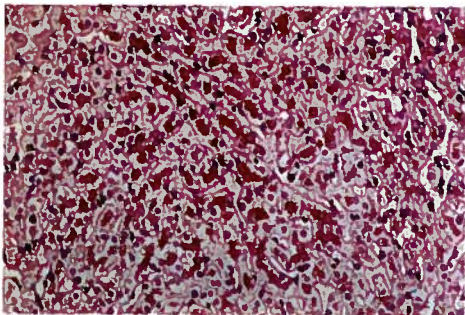


Fig. 3 — Caso 3. PAS após digestão pela amilase. x100



Fig. 4 — Caso 1. Fontana-Masson. x25

Quadro 2

*Características histoquímicas*

Caso	Perls	PAS	Ziehl-Nielsen	Fontana-Masson	Stein
1	—	++	++	+	—
2	—	+++	+++	+++	—
3	—	++	+++	++	—
4	—	++	++	—	—

*Microscopia electrónica*

Num doente (caso 4) foi feito estudo ultraestrutural do fígado. Os núcleos dos hepatocitos tinham o aspecto habitual. No citoplasma, a alteração mais importante era a presença de material amorfo electrodense, contido em estruturas rodeadas por membrana. Estes organitos, identificados como lisosomas, tinham dimensões variadas, entre 1  $\mu\text{m}$  e 4  $\mu\text{m}$ , formas irregulares, e disposição predominantemente pericanalicular (fig. 5). O material intralisosómico que constituía as granulações visíveis nos cortes de 1  $\mu\text{m}$ , era heterogénio, e apresentava-se sob formas distintas: massas compactas com elevada densidade electrónica (fig. 5 a 7) e material finamente granular de baixa densidade aos electrões (fig. 8), associados a pequenas gotas lipídicas (fig. 9). Estes aspectos em geral coexistiam nas mesmas formações lisosómicas, embora com distribuição relativa variável. As massas amorfas, compactas, e muito electrodensas constituíam, contudo, o aspecto mais frequente do pigmento.

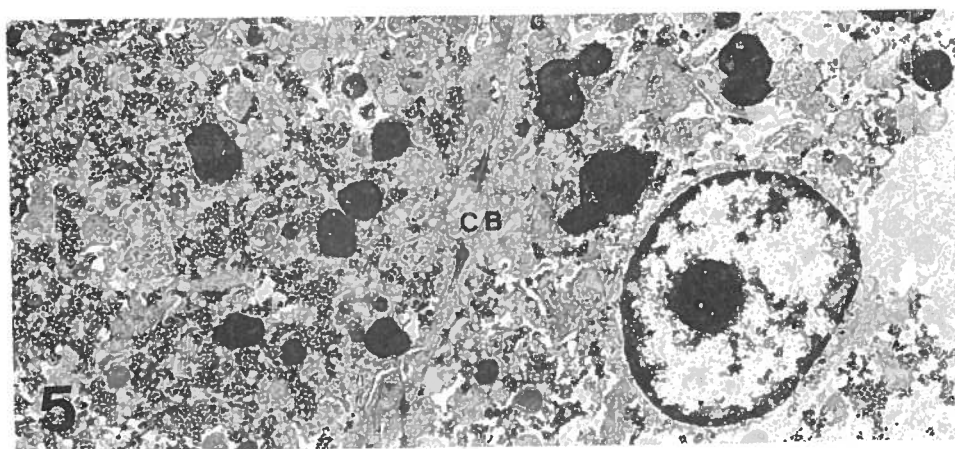


Fig. 5 — Massas osmiofílicas intralisosómicas dispostas na vizinhança de um canalículo biliar (CB) o qual não mostra alterações. As mitocôndrias têm o aspecto habitual.  $\times 6.500$

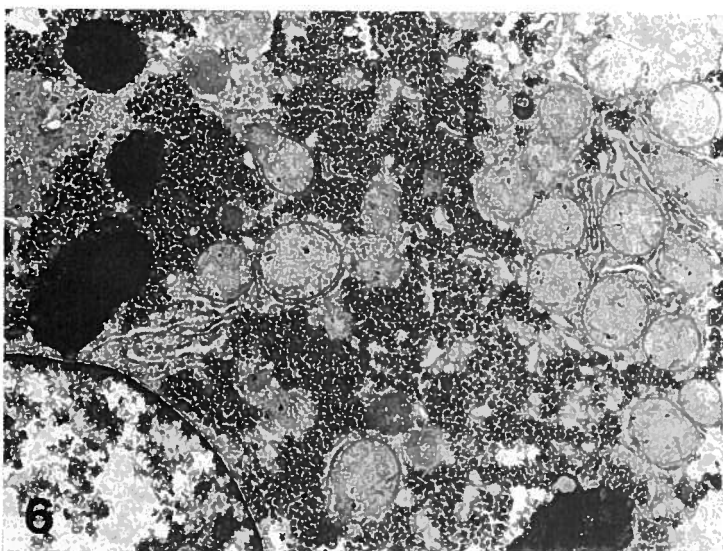


Fig. 6 — Parte de um hepatócito. Tumorção ligeira das mitocôndrias, com encurtamento e perda da orientação habitual das cristas. A densidade electrónica da matriz das mitocôndrias é inferior ao habitual.  $\times 10,500$

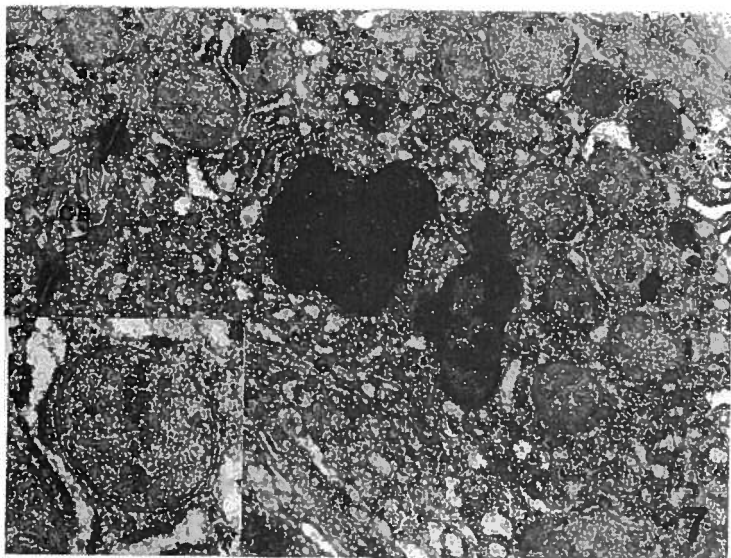


Fig. 7 — Parte de uma célula hepática vizinha de um canalículo biliar (CB). Massas amorfas muito electrodensas no interior de lisosomas. Duas mitocôndrias contêm estruturas paracrystalinas constituídas por agregados de cinco pontos densos, dispendo-se radiariamente em relação a um ponto central (setas). Peroxisomas (P). Complexo de Golgi (G).  $\times 13,000$ . No canto inferior esquerdo, grande ampliação de mitocôndria com formações paracrystalinas.  $\times 32,350$

Cerca de um terço das células hepáticas tinham alterações das mitocôndrias, no geral moderadas, sendo o aspecto mais frequente a tumefacção dos organelos com perda da orientação habitual das cristas mitocondriais (fig. 6). Em algumas células havia diminuição ou, mesmo, desaparecimento das cristas, com aspectos floculentos da matriz das mitocôndrias (fig. 9). Mais raramente foram observadas formações periódicas *em estrela*, com arranjos centrados de pontos densos (fig. 7), e enrolamentos de membranas e figuras de tipo mielina associados às mitocôndrias (fig. 10). Não havia relação aparente entre a intensidade das lesões das mitocôndrias e a quantidade do pigmento intralisosômico das células hepáticas.

O retículo endoplasmático liso e o retículo rugoso não apresentavam alterações. O complexo de Golgi estava por vezes hipertrofiado, com vesículas contendo material floculento. O número de peroxisomas estava um pouco aumentado em algumas células. A superfície sinusoidal do hepatocito e o pólo biliar da célula hepática tinham aspecto normal. O conteúdo da célula hepática em glicogénio também não mostrava alterações.

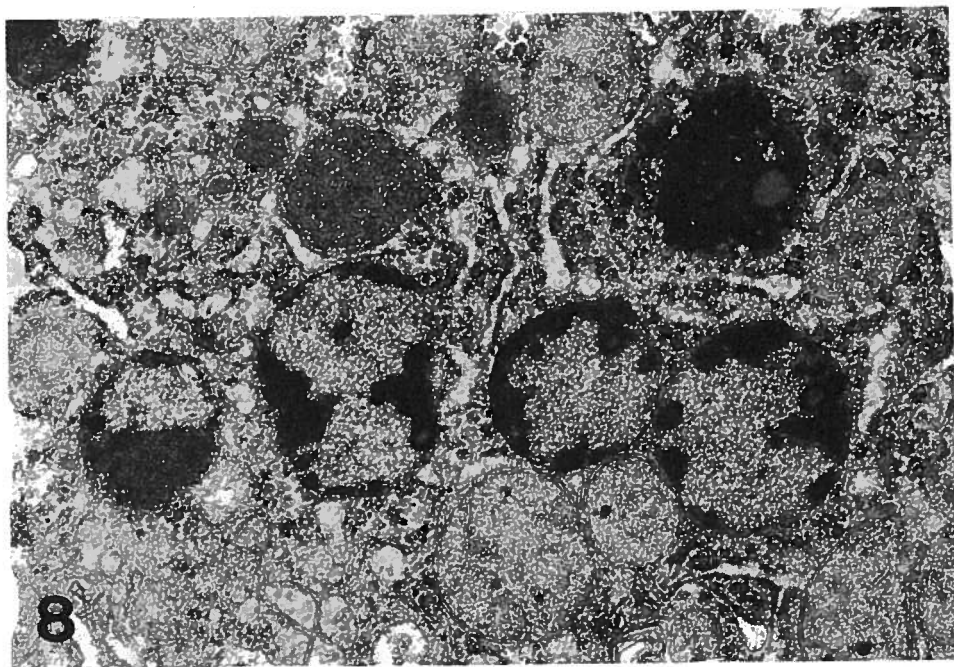


Fig. 8 — Lisosomas contendo, na parte central, material granular de média densidade electrónica e, na parte periférica, massas osmiofílicas, amorfas, de densidade elevada.  $\times 29.000$

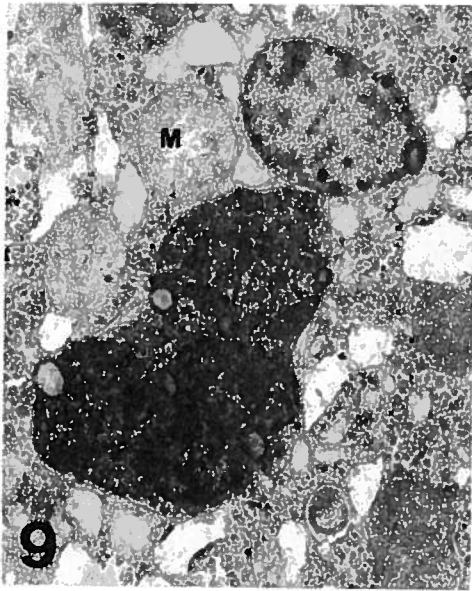


Fig. 9 — Dois lisosomas contendo massas irregulares de material amorfo, muito denso aos electrões (em baixo, na figura) e material granular, de densidade electrónica média (em cima, na figura), e gotas lipídicas (setas). Mitocôndria de matriz floculenta e sem cristas (M).  
x24.300

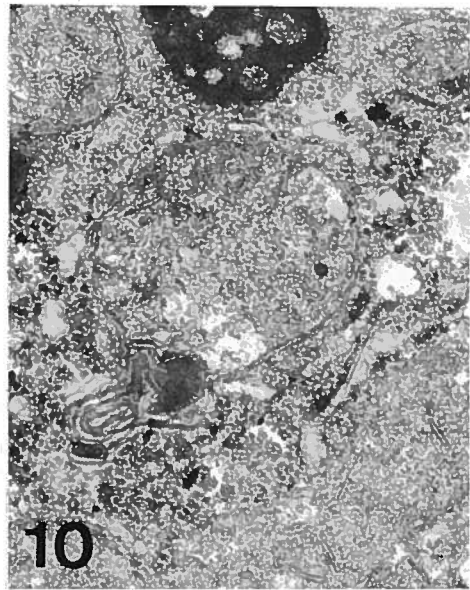


Fig. 10 — Mitocôndria com matriz floculenta e perda de cristas, associada a figura de tipo mielina. x30.300

## DISCUSSÃO

O síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz é uma doença hereditária, autosómica recessiva (Wolkoff et al 1973, Edwards 1975, Wolkoff e Arias 1975), caracterizada por uma icterícia crónica, flutuante ou persistente, de início mais frequente em adolescentes ou adultos jovens, e com relativo bom prognóstico (Dubin 1958). A doença é, em geral, assintomática ou paucissintomática, sendo as provas de função hepática normais, com excepção da hiperbilirrubinémia e do atraso na eliminação da bromossulfaleína (Mandema et al 1960, Rodes et al 1969).

Os fragmentos de biópsia hepática têm cor negra, característica dada pela acumulação intralisosómica de um pigmento castanho-escuro a negro-antracite, cuja natureza tem sido tentada identificar por métodos morfológicos, histoquímicos e ultraestruturais (Pearse 1961, Toker e Trevino 1965, Magnenat et al 1967, Oliva et al 1968, Baron et al 1969, Pages e Baldet 1969, Bruguera et al 1970, Callard et al 1970, Opperman et al 1971, Baba e Ruppert 1972, Arias 1973), e métodos bioquímicos (Seymour et al 1977).

Foram estudados quatro casos com diagnóstico de síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz, provenientes do Serviço de Anatomia Patológica do H.S.M. Em todos eles foi feito estudo histoquímico do tecido hepático e, em um deles, estudo ultraestrutural. O número escasso de casos ali registados até à data — quatro — está de acordo com a raridade da afeção, com o facto de, somente em 1954, ter sido individualizada como entidade anátomo-clínica e, provavelmente também, por só nos últimos anos se utilizar correntemente a biópsia hepática percutânea como meio auxiliar de diagnóstico.

A arquitectura lobular hepática era normal em todos os casos estudados. O pig-

mento apresentava as características morfológicas e de distribuição na célula (predomínio peribiliar) e no lóbulo hepático (predomínio centrolobular) já referidas em publicações anteriores (Dubin e Johnson 1954, Pages e Baldet 1969, Vaughan et al 1970, Giroud et al 1975). Não foi encontrado pigmento nas células de Kupffer, ao contrário das observações de Baba e Ruppert (1972) e Andres e col. (1975).

A natureza do pigmento intralisosômico tem sido objecto de vários estudos com resultados não coincidentes e, por vezes, contraditórios. Oliva e col. (1968), em 6 casos estudados, caracterizaram o pigmento como *monorrefringente, ligeiramente sudanófilo, com álcool e ácido-resistência, com grupos redutores e grupos Schiff e, não contendo ferro nem bilirrubina*. Vaughan e col. (1970) e Pages e Baldet (1969) detectaram, por técnicas histoquímicas, a presença de pigmento melânico, mas não de lipofuscina. Pelo contrário, Barone e col. (1969) e Arias (1973) identificaram a presença concomitante de lipofuscina e de melanina, donde a designação de pigmento lipomelânico por que é também conhecido o pigmento da doença de Dubin-Johnson-Sprinz.

Nos casos que estudámos os resultados são concordantes com a provável presença de ambas as substâncias nas granulações citoplasmáticas dos hepatocitos. A técnica de Ziehl-Nielsen, com tempo de coloração prolongado, mostrou características de ácido-resistência do pigmento. A coloração pelo nitrato de prata, pela técnica de Masson-Fontana, revelou, em três deles, forte argentafinidade. O método de Masson-Fontana, usado correntemente para demonstração de pigmento melânico, evidencia a presença de grupos redutores os quais existem, também, na lipofuscina. Se bem que Oliva et al (1968) não tivessem identificado a formação de complexos na presença de ferro ferroso (reação de Schmorl) nas granulações de pigmento, concluindo pela sua não especificidade para a melanina, outros trabalhos (Barone et al 1969 e Arias 1973) detectaram essa formação. A existência de melanina veio também a ser demonstrada, por análise fluorométrica, em amostras de tecido hepático de doentes com síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz, ao contrário do observado em fígados normais em que a sua presença não foi identificada (Seymour et al 1977).

A forte positividade do pigmento pela coloração pela técnica do ácido peródico, observada em todos os casos estudados, deve-se provavelmente, à peroxidação da fracção gorda que integra a lipoproteína que constitui a lipofuscina (Pearse 1961).

No estudo ultraestrutural efectuado no caso 4, a alteração mais importante foi a presença de material amorfo, heterogénio, e electrodenso intralisosômico, com características idênticas às referidas em publicações anteriores (Ichida e Funahashi 1964, Callard et al 1971, Oppermann et al 1971, Baba e Ruppert 1972, Giroud et al 1975).

O retículo endoplasmático não mostrava alterações, quer do compartimento liso quer rugoso, ao contrário do referido em outros trabalhos (Ichida e Funahashi 1964, Toker e Trevino 1965, Cussac et al 1966, Barone 1966, Oliva et al 1968, Pages e Baldet 1969, Oppermann et al 1971, Baba e Ruppert 1972).

As mitocôndrias são os organelos em que, de forma mais constante, têm sido descritas alterações no síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz. No caso estudado, contudo, essas alterações eram pouco marcadas: a grande maioria destes organelos tinha aspecto normal, apresentando somente alguns hepatocitos mitocôndrias com aspecto floculento da matriz e com alteração do número e da disposição habitual das cristas, mas sem perda da integridade da sua membrana externa. Alterações mitocondriais deste tipo, embora de intensidade variável, foram descritas por Ichida e Funahashi (1964), Barone (1966), Pages e Baldet (1969), Oppermann e col. (1971) e Enat e Barzilai (1977).

No caso estudado observaram-se, embora em número reduzido, formações paracrísticas peculiares (fig. 7) que sugerem tratar-se de arranjos periódicos distintos das estruturas habitualmente descritas como cristais intramitocondriais (Soares et al s. d.).



Estes, que têm sido vastamente referenciados nesta doença (Minio et al 1965, Barone 1966, Minio e Gautier 1967, Pages e Baldet 1969, Enat e Barzilai 1977), não foram observados no caso estudado. As formações paracristalinas observadas (fig. 7) foram também descritas em duas situações de hiperbilirrubinémia: num caso de síndrome de Rotor (Pages e Baldet 1969) e num caso de colestase por metástases hepáticas de carcinoma da mama (Soares e Nunes 1979), não sendo ainda conhecida nem a sua natureza nem o seu modo de formação.

Atendendo à intensidade das lesões das mitocôndrias e ao facto de estas serem mais marcadas nas células com maior quantidade de pigmento, Enat e Barzilai (1977) aventaram a hipótese de haver uma relação entre a patologia das mitocôndrias e a acumulação de pigmento, o que havia sido anteriormente sugerido por Giroud e col. (1975), aceitando que um défice enzimático das mitocôndrias poderia estar na origem do depósito pigmentar. No caso estudado, as alterações mitocondriais eram ligeiras, não sendo aparente a correlação entre a intensidade das lesões e a quantidade de pigmento nos hepatocitos. Este facto e a inespecificidade das alterações mitocondriais descritas, já que as mesmas podem ocorrer num grande número de doenças hepáticas de etiologias não relacionadas, sugerem como pouco provável a hipótese de Giroud e col. (1975) e Enat e Barzilai (1975). Aliás, Seymour e col. (1977), usando técnicas de centrifugação diferencial em homogeneizados de tecido hepático de dois doentes com síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz, não verificaram alterações dos perfis enzimáticos da fracção mitocondrial, ao contrário da fracção lisossomática, em que havia um aumento da actividade de todos os enzimas, nomeadamente das hidrolases ácidas. Este aumento estaria em relação com a acumulação de material não degradado nos lisosomas, como tentativa ineficaz de promover a sua degradação já que esta dependeria de um enzima deficitário. Por analogia com as situações já conhecidas de deficiência primária de um enzima lisossomático, com conseqüente acumulação de material que constitui o substracto desse enzima, Seymour e col. (1977) consideraram poder constituir o síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz também uma forma de doença lisossomática de armazenamento. Tal como naquelas situações, há um aumento da actividade das hidrolases ácidas dos lisosomas e acumulação de pigmento nestes organelos. Como a melanina não é considerada como um substracto das hidrolases ácidas e a lipofuscina é um pigmento cujo depósito aumenta com a idade, correspondendo ao conceito de *pigmento de usura*, da terminologia anátomo-patológica antiga, é pouco provável que o síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz seja devido a uma perturbação primária na degradação da melanina e/ou lipofuscina, antes sugerindo ser a acumulação destas substâncias conseqüência de um defeito primário (do equipamento enzimático dos lisosomas?) ainda por esclarecer. É também sugestiva a identificação do síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz com doenças lisossomáticas de armazenamento, como a que se associa à acumulação de colesterol (Peters e de Duve 1974), e a que se relaciona com depósito de ferro (Peters e Seymour 1976). O síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz e a hemocromatose têm em comum o facto de, em ambas as situações, haver aumento de várias hidrolases ácidas da fracção lisossómica e acumulação de material não degradado nestes organelos, conferindo cor peculiar aos hepatocitos. Mas, ao contrário da hemocromatose, os lisosomas mantêm a sua integridade morfológica e não há alterações significativas da função hepática (Seymour 1977).

O conceito de que o síndrome de Dubin-Johnson-Sprinz é uma doença lisossomática de armazenamento parece corresponder a um avanço no conhecimento da patogénese da afecção. Contudo, e apesar dos trabalhos dedicados nos últimos anos ao estudo desta doença, novos dados serão necessários para esclarecer a natureza do pigmento, o modo da sua acumulação nos lisosomas e o mecanismo íntimo da perturbação da função excretora biliar do hepatocito.

## SUMMARY

DUBIN-JOHNSON-SPRINZ SYNDROME  
LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY

A light microscopy and histochemical study was performed on the liver tissue of four patients with Dubin-Johnson-Sprinz syndrome. One of the biopsies was also studied by electron microscopy.

Dark-brown granules were observed in the liver cells. They were positive for PAS, long Ziehl-Nielsen and Masson-Fontana techniques, proving the presence of both lipofuscin and melanin. Under the electron microscope the granules corresponded to heterogenous and electron-dense material accumulated inside the lysosomes and predominantly located in the vicinity of the bile canaliculi.

The nature of the pigment is reviewed on the basis of the recent literature devoted to the morphological and biochemical study of the Dubin-Johnson-Sprinz syndrome, assumed as a secondary lysosomal storage disease.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDRES AG, MEGIAS AP, MAILLO GA, MOYA JE: Enfermedad de Dubin-Johnson. A proposito de dos casos. *Rev Esp Enf Ap Digest* 46: 553, 1975.
- ARIAS IM: Bilirubin metabolism and inheritable jaundice. *Israel J Med Sci* 9: 1419, 1973.
- BABA N, RUPPERT RD: The Dubin-Johnson syndrome: electron microscopic observation of hepatic pigment—a case study. *Am J Clin Pathol* 57: 306, 1972.
- BARONE P: Colostasis intracellulare pura. *Virchows Arch Path Anat* 341: 43, 1966.
- BARONE P, INFERRERA C, CARROZZA G: Pigments in the Dubin-Johnson syndrome. In: *Pigments in Pathology*. Ed. Wolman E, Academic Press. New York. p. 307, 1969.
- BRUGUERA M, ESQUERDA JE, RODES J: Consideraciones acerca de la naturaleza del pigmento de la enfermedad de Dubin-Johnson. *Rev Clin Esp* 117: 151, 1970.
- CALLARD P, GANTER P, KALIFAT SR, DUPUY-COIN AM, DELARUE J: Étude cytochimique et ultrastructurale du pigment d'un cas de maladie de Dubin-Johnson. *Virchows Arch Abt B Zellpath* 7: 63, 1971.
- COHEN L, LEWIS C, ARIAS IM: Pregnancy oral contraception and chronic familial jaundice with predominantly conjugated hyperbilirubinaemia (Dubin-Johnson Syndrome). *Gastroenterology* 62: 1182, 1972.
- CUSSAC Y, PORTE A, MANDARD JC, VOEGTLIN R, CARBILLET JP, TOUJAS L: Modifications ultrastructurales des hepatocytes dans un cas d'ictère chronique idiopathique de type Dubin-Johnson. *Ann Anat Pathol* 11: 37, 1966.
- DUBIN IN, JOHNSON FB: Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells. *Am J Med* 33: 155, 1954.
- DUBIN IN: Chronic idiopathic jaundice. A review of fifty cases. *Am J Med* 24: 268, 1958.
- EDWARDS RH: Inheritance of the Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 68: 734, 1975.
- ENAT R, BARZILAI D: Mitochondrial pathology in the liver in a patient with the Dubin-Johnson syndrome. *Israel J Med Sci* 13: 1197, 1977.
- GIROUD M, PAGE G, CARRIGUE G, SEIGNEURIC A, CLUZEAU C: À propos d'une nouvelle observation de maladie de Dubin-Johnson. Étude anatomopathologique et ultrastructurale. *Ann Med Interne* 126: 711, 1975.
- HELLER F, NINANE G, LEBACQ EG: Syndrome de Dubin-Johnson-Sprinz. Association d'une anémie hémolitique congénitale, d'une photosensibilité cutanée et de troubles du métabolisme des porphyrines. Version humaine du syndrome du mouton Corriedale? *Acta Gastro-Enterol Belg* 40: 77, 1977.
- ICHIDA F, FUNAHASHI H: Electron microscopic observations on liver cells of cases with Dubin-Johnson syndrome. *Acta Hepatosplenol* 11: 332, 1964.
- MAGNENAT P, PALUELLO FM: Les ictères idiopathiques chroniques. Étude ultrastructurale et remarques pathogéniques. *Schweiz Med Wochenschr* 97: 1102, 1967.
- MANDEMA F, De FRAITURE NH, NIEWEG HO, ARENDS A: Familial chronic idiopathic jaundice (Dubin-Sprinz disease) with a note on BSP metabolism in this disease. *Am J Med* 28: 42, 1960.

- MINIO F, ALIBERTI F, GARDIOL D, GAUTIER A, MAGNENAT P, TORSOLI A: L'ultrastructure du foie humain lors d'ictères idiopathiques chroniques. II — Étude d'un cas atypique d'ictère à bilirrubine directe. *Z Zellforsch* 66: 496, 1965.
- MINIO F, MAGNENAT P, GARDIOL D, GAUTIER A: L'ultrastructure du foie humain lors des ictères idiopathiques chroniques. II — Étude d'un cas atypique d'ictère à bilirrubine directe. *Z Zellforsch* 66: 496, 1965.
- OLIVA H, NAVARRO V, BARAT A: Histoquímica y ultraestructura de la enfermedad de Dubin-Johnson. *Rev Clin Esp* 110: 397, 1968.
- OPERMANN A, CARBILLET JP, GISSELBRECHT H, PAGEAUT G, CLEMENT D: Syndrome de Dubin-Johnson: Données ultrastructurales. *Sem Hop Paris* 47: 2721, 1971.
- PAGES A, BALDET P: Le syndrome de Dubin-Johnson. *Ann Anat Pathol* 14: 77, 1969.
- PEARSE AGE: Pigments. In: *Histochemistry*. Churchill. London, p. 632. 1961.
- PETERS TJ, de DUVE C: Lysosomes of the arterial wall. II — Subcellular fractionation of aortic cells from rabbits with experimental atheroma. *Exp Mol Med* 20: 228, 1974.
- PETERS TJ, SEYMOUR CA: Acid hydrolase activities and lysosomal integrity in liver biopsies from patients with iron overload. *Clin Sci Mol Med* 50: 75, 1976.
- RODES J, COLL-MONEGAL J, BRUGUERA M: Enfermedad de Dubin-Johnson. *Rev Clin Esp* 115: 117, 1969.
- RODES J, ZUBIZARRETA A, BRUGUERA M: Metabolismes de la bromosulfaleína (BSF) en la enfermedad de Dubin-Johnson. *Rev Clin Esp* 115: 125, 1969.
- SCHINELLA RA: Jaundice with Dubin-Johnson-Sprinz syndrome precipitated by oral contraceptives. *N York State J Med* 72: 2810, 1972.
- SCHOENFIELD LJ, MCGILL DB, HUNTON DB, FOULK WT, BUTT HR: Studies of chronic idiopathic jaundice (Dubin-Johnson syndrome). *Gastroenterology* 44: 101, 1963.
- SELIGSOHN U, SHANI M: The Dubin-Johnson syndrome and pregnancy. *Acta-Hepato-Gastroenterol* 24: 167, 1977.
- SEYMOUR CA, NEALE G, PETERS TJ: Lysosomal changes in liver tissue from patients with the Dubin-Johnson-Sprinz syndrome. *Clin Sci Mol Med* 52: 241, 1977.
- SHERLOCK S, SHARP HL, TAVILL AS: Metabolic disorders and fatty liver. In: *Diseases of the Liver and Biliary Tract. Standardization of nomenclature, diagnostic criteria and diagnostic methodology*. Ed. Leavitt Jr. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago. p. 54. 1976.
- SOARES JO, MOURA NUNES JF: Intramitochondrial paracrystalline inclusions in human hepatocytes. *Am J Clin Pathol* 71: 479, 1979.
- SOARES JO, MOURA NUNES JF, RODRIGUES FC: Observações não publicadas.
- SPRINZ H, NELSON RS: Persistent non-hemolytic hyperbilirrubinaemia associated with lipochrome-like pigment in liver cells; report of four cases. *Ann Int Med* 41: 952, 1954.
- TOKER C, TREVINO N: Hepatic ultrastructure in chronic idiopathic jaundice. *Arch Pathol* 80: 456, 1965.
- VAUGHAN JP, MARUBBIO AT, MADDOHKS I, COOKE RA: Chronic idiopathic jaundice in Papua and New Guinea: a report of nine patients with Dubin-Johnson's or Rotor's syndrome. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 64: 287, 1970.
- WOLKOFF AW, ARIAS IM: Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 69: 1039, 1975.
- WOLKOFF AW, COHEN LE, ARIAS IM: The inheritance of the Dubin-Johnson syndrome. *N Engl J Med* 288: 113, 1973.

Pedido de separatas: J. O. Soares

Unidade de Microscopia Electrónica  
Faculdade de Medicina de Lisboa  
Lisboa - Portugal