### DR. CUSTODIO VIEIRA DA CUNHA

ASSISTENTE DO LABORATORIO BACTERIOLOGICO DA DIRETORIA DE HIGIENE E SAUDE PUBLICA DO ESTADO.

ASSISTENTE DA CADEIRA DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA GERAL DA FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE.

# CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO HISTOFISIOLOGICO

DOS

# HEMATOBLASTOS



1934 OFICINAS GRÁFICAS DA LIVRARIA DO GLOBO PORTO ALEGRE



### DR. CUSTODIO VIEIRA DA CUNHA

ASSISTENTE DO LABORATORIO BACTERIOLOGICO DA DIRETORIA DE HIGIENE E SAUDE PUBLICA DO ESTADO.

ASSISTENTE DA CADEIRA DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA GERAL DA FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE.

# CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO HISTOFISIOLOGICO

DOS

## HEMATOBLASTOS

1934

OFICINAS GRÁFICAS DA LIVRARIA DO GLOBO BARCELLOS, BERTASO & CIA. + PORTO ALEGRE - FILIAIS: SANTA MARIA E PELOTAS +

CONTRACTOR DESCRIPTION OF THE PROPERTY OF THE

Bib.Fac.Med.DFRGS

T-0256

Contribuicao ao estudo histofi

In book winter of the second o

### EXORDIO

A quem se resolve escrever tése sobre ciencia médica, uma natural dificuldade desde logo se apresenta, inevitavel: a escolha do tema.

Não que seja exigua a materia. Pelo contrario, vasto é o campo que a ciencia médica já minuciosamente perqueriu, e mais ampla é ainda a zona a explorar. Naquele, porém, pouco restará a dizer de interessante ou inedito; e nesta, as incursões, para resultarem proficientes, exigem autoridade indiscutivel. Daí, as nossas dificuldades.

A escolha do tema "Hemotoblasto" justifica-se por varios motivos. Embora antiga e debatida, a questão é ainda hoje controversa. Varios são ainda os pareceres dos doutos e dos estudiosos, procurando fixar a genese do "Hematoblasto", as suas funções normais e patologicas e o seu proprio numero existencial. Os multiplos processos de contagem aconselhaveis agravam essas divergencias, que subiram ainda de ponto depois dos ultimos estudos sobre as sindromes hemorragicas, em cuja genese hematologistas eminentes atribuem papel preponderante ás plaquetas.

Por outro lado, o fato de exercemos o cargo de assistente da cadeira de Histologia e Embriologia geral na Faculdade de Medicina de Porto Alegre, torna

natural tenhamos procurado para objeto do presente trabalho um assunto dentro dessa especialidade.

Aceitando a sugestão do eminente professor Pereira Filho, cuja amizade nos desvanece, escolhemos, pois, o referido tema, e, além do estudo normal do mesmo, traçamos um esboço comparativo de diversas tecnicas de contagem, bem como da variação do numero de hematoblastos nos diferentes estados fisiologicos.

Antes de encerrarmos estas linhas preambulares, desejamos expressar o nosso reconhecimento ao prezado colega Dr. J. Maya Faillace pelas atenções e facilidades que nos dispensou, bem como ás demais pessoas que, permitindo experiencias e pesquisas, muito auxiliaram a elaboração deste despretenciso trabalho.

#### SUMARIO

CAPITULO I
Historico

Morfologia

Genese

CAPITULO IV Fisiologia

CAPITULO V Numero

CAPITULO VI Tecnicas de contagens dos Hematoblastos

> CAPITULO VII Observações

CONCLUSÕES
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Afora outros erros que escaparam á revisão, em vista da pressa com que fomos obrigados a mandar imprimir este trabalho, devem ser retificados os seguintes:

Pag. 13 linha 22 — excentrica onde rolam os globulos brancos; a outra central em que,...

Pag. 19 linha 27 — alteração em vez de lateração.

19 " 28 — do globulino em vez de do globulo.

" 124 " 24 — de urea ou ao envelhecimento da solução.



### CAPITULO I

### HISTORICO

São os seguintes os elementos anatomicos do sangue, contidos em suspensão no plasma durante a circulação sanguinea:

1.º os globulos vermelhos ou hematias

2.º os globulos brancos ou leucocitos

 os globulinos, hematoblastos, plaquetas ou trombocitos.

Deixaremos de lado o estudo dos dois primeiros, para só nos ocuparmos do 3.º elemento, que constitue

o objeto do nosso trabalho.

O terceiro elemento do sangue, que parece tersido observado por varios antigos anatomistas (Fr. Simon), no sangue dos mamiferos, entre diversas variedades de granulações incolores, recebeu em 1844 de Donné o nome de "globulins", pequenos elementos muito menores que as hematias.

O nome de globulino em seguida foi frequentemente empregado para designar os corpusculos incolores do sangue. Assim Milve Edwards, confundia-

os com particulas de gordura.

A primeira descrição um pouco pormenorizada é devida a **Zimmermann** (1874) que deu a esses elementos o nome de "corpusculos ou vesiculas elementares" (Elementar-Bläschen).

L. Beale (1864 assinalou, de novo, esses elementos, mas de modo bem impreciso, sob o nome de "particulas de materia germinal".

Max Schultz (1865) deu uma descrição bastante nitida e assinalou-lhe a propriedade de se aglutinar; designou-os sob o nome de "massas de granulações ou Kugel", considerando-os como diferentes das vesiculos elementares de Zimmermann, que para ele são produções artificiais.

Acredita M. Schultz que as massas de granulações são provenientes da destruição do globulo branco, concepção que foi retomada em 1872 por L. Riess.

Vulpian (1873) numa sessão da Sociedade de Biologia, descreveu no sangue, corpusculos incolores, livres ou aglomerados, que aderiam muito rapidamente ás laminas de vidro e que serviam de ponto de partida ás fibrilas no momneto de coagulação.

Ranvier, na mesma sessão da Sociedade de Biologia deu uma descrição do reticulo fibrinoso do sangue humano, considerando como simples pequenas massas de fibrina as granulações donde parte a rede fibrinosa.

W. Osler (1874) assinalou pequenos elementos, que são verdadeiramente globulinos, nas venulas de jovens ratos, que haviam sido sacrificados recentemente.

Von Recklinghausen (1866) descreveu no sangue da rã, muitos dias depois de sua saida do organismo, massas de celulas, fusiformes e elipticas incolores, de que algumas tomam no fim de certo numero de dias coloração tão intensa como a dos globulos vermelhos.

Gobulew (1866) descreve celulas fusiformes no sangue fresco e nos vasos capilares de rã de inverno. Foi em 1877, que sob o nome de "hematoblastos", **Hayem**, esclareceu em seus pormenores morfologicos no sangue da rã, o 3.º elemento do sangue: pequenos corpusculos, extremamente alteraveis, incolores, interpretando-os como progenitores do globulo vermelho.

Bizzozero em 1882, quatro anos após as primeiras publicações de Hayem, confirmava a descrição do 3.º elemento do sangue, dando-lhe o nome de "piastrine" (plaquetas), na circulação mesenterica de pequenos mamiferos anestesiados.

Após os trabalhos de Hayem e de Bizzozero, muitos outros foram publicados sobre os hematoblas-

tos ou globulinos ou plaquetas.

A escola alemã com os grandes mestres Pappenheim e Hirschfeld á frente, a escola inglesa com Wright, a escola italiana com Ferrata e Rinaldi, os autores francêses Chevreuil e Roger, Lesourd e Pagniez, Achard e Aynaud, Jolly e Mouzon, os sabios do mundo científico inteiro como Firket, Roskam, Fusari, Afanassiew, Pizzini, Helber, Dettermann, Schenk, Tchistowitch, Brodie, Russel, Kemp, Calham, Harris, Pruse, etc. etc. retomaram o estudo dos hematoblastos. Mas em lugar de esclarecer a questão da natureza das plaquetas tornaram o problema mais complexo e cheio de controversias indefinidas, por causa da divergencia em suas conclusões, como teremos ocasião de verificar em capitulos sucessivos.

#### CAPITULO II

#### MORFOLOGIA

A morfologia das plaquetas pode ser estudada seja sobre preparados frescos, seja pelo metodo das colorações vitais, seja emfim sobre preparados fixados.

Uma das razões que têm motivado opiniões muito diversas a respeito dos hematoblastos, é que estes elementos são extremamente frageis e alteraveis, de maneira que foram sempre observados sob uma forma mais ou menos modificada. Para poder observar os caracteres exatos, é necessario estudá-los com auxilio de tecnicas apropriadas.

NO SANGUE CIRCULANTE: Hayem examinando as membranas transparentes de animais, tais como cobaios, coelhos, gatos recem-nacidos, rãs, etc, observou que se chega a um momento em que a circulação é bastante moderada em certos pontos, tornando-se os elementos do sangue individualmente distintos nos pequenos vasos. Notou mais que a coluna sanguinea está dividida em duas partes, uma periferica ou excentrica em que os deslocamentos são mais rapidos, formados de globulos vermelhos, entre os quais são interpostos, aqui e acolá, numerosos corpusculos incolores menos volumosos que as hematias.

Nos mamiferos, esses corpusculos de aspetos vitreos, ceriformes, são bastante regularmente ovoides, e analogos a um grão de arrôs visto de campo a um bastonete. Nos amamalianos (para esses exames empregou o mesenterio de rã), os elementos (hematoblastos) interpostos entre as hematias são incolores, ceriformes e sensivelmente menos volumosos que os globulos vermelhos. A forma é variavel e mais frequentemente de um ovoide mais ou menos pontudo. Algumas vezes parece a de uma raqueta. Entretanto um só e mesmo elemento pode parecer ovoide, fusiforme ou arredondado, segundo se apresenta no campo microscopico. Os hematoblastos no sangue seguem como as hematias o meio da corrente sanguinea e não têm nenhuma tendencia a se imobilizarem como os globulos brancos na camada estatica externa. Possuem certa mobilidade que permite insinuarse mudando de forma, através dos obstaculos que encontra, e retomarem, desde que possam a forma tipica primitiva. São lisos, homogeneos, de reflexo menos prateado que os leucocitos, deixando perceber uma mancha levemente sombria central que ocupa o logar do nucleo e para fóra dessa mancha, uma ou duas granulações brilhantes que se observam mais especialmente na rã temporaria, durante o inverno.

As verificações feitas por Georges Hayem, sobre o mesenterio da rã (1879) foram confirmadas por diversos autores e principalmente por Eberth e Schimmelbusch (1885). Laker, ao contrario (1889), estudando a circulação na asa do morcego, coloca os hematoblastos na zona periferica. Aynaud retomou estes estudos nos capilares do epiploo de coelhinhos em que ele viu no meio dos outros elementos do sangue, circularem globulinos palidos e alongados. Ele igualmente estudou-os sob fragmentos de

epiploo imediatamente depois da morte do animal que ele acabava de sacrificar, examinando esses fragmentos em agua fisiologica morna, na platina aquecedora.

NO SANGUE HUMIDO PURO — Nos mamiferos Hayem analisou os hematoblastos do sangue puro á temperatura do laboratorio ou a temperatura vizinha de 0°, empregando o seguinte dispositivo: Depois de ter desengordurado com alcool ou eter as laminas de vidro, enxugou-as e secou-as com cuidado, fixou a laminula sobre a lamina deixando caír sobre os quatros cantos uma gota de parafina fundida. Obteve assim um espaço capilar preparado a receber o sangue. A gota de sangue é colocada sobre o bordo da laminula no momento mesmo em que se faz a compressão da polpa do dedo ou da ferida quando em um animal. Coloca depois a lamina na platina do microscopio. A grande alterabilidade dos hematoblastos é suspensa quando a temperatura é vizinha de 0°. Para facilitar a observação em baixa temperatura Hayem utilizou-se da celula com ranhura que é montada por processo qualquer, a baixa temperatura.

Entre lamina e laminula — Assim que o sangue chega ao contato do espaço capilar, precipita-se com força e vêm-se diversos elementos rolar com rapidez. Em logares onde a corrente é mais lenta, distinguem-se os hematoblastos. No meio dos globulos vermelhos e brancos percebem-se muitas pequenas celulas que não tardam a tornar-se espinhosas e aderir ao vidro; deslisam, empalidecem, perdendo uma parte de sua substancia e tendo uma tendencia a se unirem entre si quando se encontram, formando massas ou especies de cadeias.

Na celula com ranhura e á baixa temperatura —

A temperatura mais favoravel para o estudo das plaquetas conforme Hayem é a — 1.° a — 1.°, 5. Nos intervalos das pilhas de hematias, percebem-se elementos delicados, isolados ou dispostos por pequenos grupos, mas não unidos entre si. Alguns parecem discoides, outros têm uma forma de raqueta, outros ainda são angulosos ou acanalados. Em suma, os menos modificados são ovoides, arredondados ou em virgula. Parecem homogeneos, têm um aspeto coloide ou levemente vitreo.

Nos não mamiferos, entre lamina e laminula (ex: rã) -- Nos primeiros segundos do exame, os hematoblastos conservam a aparencia de corpusculos palidos, ovoides, fusiformes ou amigdaloides, menores que as hematias e de volume analogo ao dos leucocitos. Manifestam como os hematoblastos dos mamiferos, viscosidade notavel. Aderem á lamina e como são muito extensiveis, a corrente liquida fálos tomar, desde que sejam fixados á lamina, uma forma alongada desmesurada. Ao se encontrarem, aderem entre si, e apenas um desses elementos é retirado em um ponto que se torna o centro de formacão de massa cujo volume depende da espessura da camada de sangue. Essas massas fixadas solidamente na preparação por causa de sua aderencia ao vidro, constituem especies de pilares que retem na passagem alguns globulos vermelhos e brancos e ao redor dos quais as hematias se acumulam formando uma serie de circulos cada vez maiores. Quando a corrente liquida para e a camada de sangue está em equilibrio entre a lamina e laminula, os globulos vermelhos ficam dispostos de modo a formar rosaceas mais ou menos regulares e extensas, cujo centro é formado por uma massa de plaquetas e alguns leu-

«cocitos. Nos intervalos entre as rosaceas, notam-se

alguns hematoblastos isolados e globulos brancos. Durante o curto espaço de tempo necessario para manter em equilibrio os elementos do sangue, os hematoblastos já se acham alterados.

Nas proximidades de 0°, os hematoblastos ficam um certo tempo sem sofrer alteração sensivel. Ficam isolados ou dispostos em grupos de 2 - 3 - 4 elementos. No fim de um tempo variavel (1 ou mais horas) os hematoblastos alteram-se levemente, eriçando-se de pequenos pontos curtos, palidos que perde por dissolução uma parte de seu disco emquanto o nucleo se torna mais nitido e mais granuloso. Esses factos mostram que os hematoblastos dos não mamiferos são constituidos por uma especie de disco quasi homogeneo (em geral alongado, ovoide ou fusiforme) no interior do qual se vê um nucleo relativamente volumoso, granuloso, arredondado ou ovoide.

Autores recentes lançaram mão de metodos mais complicados e estudaram sobretudo esses elementos nos mamíferos.

É assim que Achard e Aynaud em gota pendente, descrevem seus globulinos como pequenos bastonetes, um pouco oval, fortemente refringentes, do comprimento de 2 a 3 micros. Esses caracteres são sobretudo faceis de evidenciar no sangue do asno, em razão de sua tendencia á sedimentação espontanea.

Os animais de estudos foram, como acabamos de dizer, principalmente o asno e tambem o cavalo, animais estes cujo sangue além de facilmente sedimentavel é tambem pouco coagulavel. Com trocarte parafinado Aynaud puncionou a jugular através do tegumento, desprezando as primeiras porções de sangue e fazendo compressão. Em seguida recolhia o

sangue em vasos tambem parafinados. Durante o verão, á temperatura de 25º era desnecessario a platina aquecedora, sendo suficiente um simples celula comum. Com pipeta parafinada, tirava uma gota de plasma incolor e levemente turvo que sobrenadava acima dos globulos vermelhos e depositava sobre uma laminula envaselinada que em seguida colocava sobre a celula. O exame era feito com objetiva seca n.º 8 e 9 ou com imersão 1/12, de grande foco. O campo inteiro era ocupado por um numero muito grande de elementos incolores e de forma alongada; notavamse entre esses elementos algumas hematias e um certo numero de leucocitos, absolutamente intatos que não apresentavam nenhuma sinal de fragmentação, nem havia traços de coagulação, nem o menor filamento de fibrina. A preparação só apresentava hematias leucocitos e globulinos. Para bem observar os globulinos era necessario diafragmar fortemente. Eram muito mais palidos, mais ou menos refringentes e brilhantes do que os leucocitos. No inicio da observação todos apresentam uma forma alongada com o aspeto de verdadeiros bastonetes 3 - 4 vezes mais longos que largos. Atingiam os maiores no seu comprimento quasi o diametro das hematias, com um halo brilhante que os separava do meio ambiente. Eram sempre absolutamente incolores e de estrutura perfeitamente homogenea. Não se observavam nunca hemoglobina nem granulações brilhantes identicas ás granulações dos leucocitos. Apresentavam perpetuos movimentos oscilatorios que os deslocava fracamente no campo da preparação. No fim de um certo tempo os elementos arredondados tornavam-se cada vez mais abundantes, completamente isolados, sendo a viscosidade completamente nula. Sómente após uma ou duas horas sobrevinham a coagulação e a aglutinação

dos globulinos. As alterações morfologicas que se produzem pela unica influencia do fator tempo, podem ser observadas imediatamente, quando se resfriam os globulinos a 0° ou se aquecem a 45° ou ainda quando se submetem á ação de agentes quimicos (vapores de eter, coloroformio, sol. de quinina, cocaina, etc.). Segundo a intensidade ou a duração dessas ações alterantes, obtem-se aspetos morfologicos diferentes: formas simplesmente arredondadas, formas arredondadas e estreladas, com finos prolongamentos e aparecimento de uma substancia granulosa no interior, ou ainda formas de alterações longas com finos prolongamentos que simulam um flagelo.

Com o mesmo metodo, Aynaud obteve identicos resultados com outros mamiferos e com o homem particularmente.

Este metodo é interessante. Mas os hematoblastos com ele não são estudados nas suas relações com os outros elementos do sangue como no metodo de Hayem, que observa realmente o sangue puro e completo. Demais, em gota pendente os hematoblastos são deformados sob a influencia do peso e tomam por isto um aspeto especial (Hayem).

Aynaud fez notar que si a principal diretriz da tecnica era evitar a coagulação do sangue, pesquizas ulteriores mostraram-lhe que não era a coagulação em si que alterava os globulinos mas que lateração do globulo e coagulação eram dois fenomenos que evolviam paralelamente produzidos por uma mesma causa, o contato dos tecidos.

Evitar o contato dos tecidos mecanicamente, é a primeira condição de observação dos globulinos cujo estudo se torna impossível no sangue cutaneo (Aynaud).

Pagniez e Mouzon, estudando os globulinos no

sangue citratado, diluido no liquido de Marcano, descrevem-nos como bastonetes retilineos, muito finos cercados de uma aureola muito brilhante, animados de movimentos oscilatorios e de balancin, bastante rapidos, e de movimentos mais lentos de translação em massa. No fim de meia hora caem no fundo da celula e, tomando agora uma forma arredondada, sem halo. Si agora exercemos uma leve pressão sobre a lamina que recobre a camara humida, vemos muitos pequenos discos deitados, erguerem-se e retomar aspeto movel em forma de bastonetes. Trata-se, porem, de aspetos diferentes segundo a incidencia do raio visual. Concluem que nos meios fixadores ou citratados, esses elementos têm o aspeto de pequenos discos de planos paralelos.

Esta descrição não contradiz em nada aos dados por Hayem para os hematoblastos observados no sangue puro a O°, condições nas quais eles se assemelham mais a grãos de arrôs.

Os hematoblastos podem egualmente ser estudados ao ultra-microscopio com sangue puro ou citratado.

Assim Aynaud, em razão de grande alterabilidade dos globulinos ao contato do vidro e da necessidade de fazer preparações finas, procede da seguinte maneira: Prepara plasma pelo metodo dos tubos parafinados. O ultra-microscopio estando centrado e iluminado, fez preparações entre a lamina e laminula e examinou imediatamente. Observou que os globulinos apresentaram-se sob a forma arredondada de contornos nitidos, aspeto esse que durou apenas alguns segundos.

Rapidamente, os globulinos tornaram-se irregulares, angulosos e emitiam finos prolongamentos.

ESTUDO DOS HEMATOBLATOS NO SAN-GUE LIQUIDO COM O AUXILIO DAS COLORA= CÕES VITAIS — Ehrlich foi o primeiro que preconizou os córantes ditos vitais que foram depois aplicados por Levaditi (1901), Rosini e Bibergeil (1904), Puchberger, Pappenheim, Cesaris-Demel, Weindenreich, Ferrata etc., para o estudo dos hematoblastos. As substancias córantes mais usadas são o azul brilhante de cresilio, o azul I e o vermelho neutro. O processo de tecnica mais adotado é o de estender sobre lamina a camada finissima de solução alcoolica da substancia córante e deixar evaporar-se. As plaquetas assim córadas aparecem em preparados bem feitos, quasi, sempre com forma levemente oval, com notavel disparidade de volume tambem em condições normais, tanto que alguns desses são um pouco menos que um globulo vermelho, outro de dimensões assaz menores.

Todos, porém, concordam no seu carater morfologico geral, na presença de duas partes bastante distintas, uma descorada, algumas vezes levemente corada de amarelo esverdeado que forma a parte principal da plaqueta, uma outra nitidamente granulosa corada de azul bastante intenso. Estas duas partes foram denominadas por Puchberger com o nome de hialómero e cromomero, sendo, porém, de dever recordar que os primeiros observadores que demonstraram com as colorações vitais, a diferenciação das plaquetas em dois elementos, hialomero e cromomeros foram Celli e Guarnieri já em 1889.

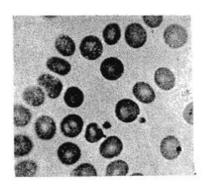
A relação entre o cromomero e hialomero não são sempre os mesmos. Algumas vezes o hialomero constitue quasi que só toda a plaqueta e o cromomero é reduzido a uma pequena particula excentrica; em outros casos o cromomero é bastante volumoso e ocupa quasi completamente a plaqueta. Contudo bastante varia é a posição que ocupa o cromomero; geralmente é excentrico, em alguns casos, entretanto ocupa uma posição central; no seu carater morfologico geral, o cromomero e o hialomero recordam um pouco o nucleo e o protoplasmo de uma celula. Entretanto, por este seu aspeto que em suas linhas gerais se mantem constante tambem em preparados fixados, alguns autores, entre os quais Kopsch, Deetjen, Argustinski, reconhecem no cromomero um caracter nuclear.

Aynaud critica, os resultados de Puchberger Rosin e Bibergeil, Levaditi e Cesaris-Demel, afirmando que, usando a tecnica de Pappenheim, Cesaris-Demel (solução alcoolica de azul brilhante de cresilio, dessecada sobre a lamina), as plaquets se alteram profundamente e o pretenso cromomero não parece mais do que um precipitado. Segundo Avnaud, terse-á coloração vital verdadeira, sómente estudando as plaquetas do plasma estabilizado com citrato e oxalato alcalinos. Aynaud e Achard usam com tal escopo, pequeno traço de uma solução fisiologica a 1 % de vermelho neutro acrecido ao plasma estabilizado, de modo que o vermelho neutro permaneça na diluição de 1 p. 5.000 até 1 por 20.000. Com tal processo de tecnica descrevem nas plaquetas a presença de duas a tres granulações bastante grande que morfologicamente são completamente diversos daqueles postos em evidencia com o azul brilhante de cresilio. Ferrata não crê completamente exata a critica de Aynaud, e não admite que o cromomero corado com azul brilhante de cresilio seja o resultado de uma precipitação da substancia córante, sobretudo porque tambem com observações a fresco com sangue descorado se verifica já manifesta a parte granulosa das plaquetas e porque tambem nos orgãos hematopoéticos com fixadores mais variados a estrutura das plaquetas é fundamentalmente a mesma. Tambem em condições normais, mais frequentemente, em condições patologicas, notam-se com as granulações azues do cromomero, algumas outras granulações coradas metacromaticamente de violete com o azul brilhante de cresilio (Cesaris-Demel). Com Sudan III, em algumas plaquetas são demonstraveis pequenas gotas de gordura, (Cesaris-Demel e Ferrata), Aynaud, no entanto, afirma que os globulinos não contém nunca granulações de gorduras.

MORFOLOGIA DAS PLAQUETAS SOBRE PREPARADOS FIXADOS — Numerosos metodos foram indicados para o estudo das plaquetas, sendo os mais empregados os obtidos com colorações com o liquido de Giemsa, depois da fixação com alcool metilico ou com o acido osmico (Weidenreich), com o liquido de May-Grünwald ou o panoptico de Pappenheim. Em preparações de sangue fixados pelos vapores de acido osmico que atuam sobre a camada de sangue espalhado e não dessecado, os globulinos aparecem ora isolados ora, o mais frequentemente agrupados em pequenas massas. O contorno é irregularmente arredondado ou mais frequentemente ovalar. substancia aparece homogenea e levemente corada pela maior parte das cores nucleares, mas de maneira muito intensa que a cromatina. As preparações obtidas por dessecação dão resultados comparaveis, mas os globulinos aí são menos nitidos e seus contornos menos nitidamente limitados e são menos corados. O emprego de reativos corantes que contenham eosinato de azul (Giemsa etc.) permitem corar, no centro dos globulinos, finas granulações avermelhadas ou violaceas. Esses grãos não têm nenhuma afinidade particular para a maior parte dos córantes nucleares (safranina, verde de metilio, hematoxilina). Aparecem muito nitidamente quando o sangue foi fixado no estado fresco, por um reativo com acido acetico. Podemos corá-los pela hematoxilina ferrica. depois da fixação do sangue fresco, pelo sublimado acetico. A fixação do sangue fresco por sedimentação numa solução de acido osmico a 1 % ou numa solução de formol a 10 %, á qual é bom acrescentar 1 % de cloreto de sodio, permite obter os contornos dos globulinos melhor fixados que pelos metodos precedentes; aparecem então ovalares, nitidamente limitados, ao passo que sobre preparações dessecadas estão frequentemente reunidas em massas. A facilidade com a qual os globulinos se alteram no sangue fresco e a dificuldade de os obter bem fixados, fazem com que eles fossem confundidos com produtos de destruição dos leucocitos e de hematias, o que permitiu a muitos autores, como Löwit, duvidarem da sua existencia no sangue circulante.

Corando com o Giemsa, as plaquetas, sobre preparados por esfregaço bem feito, aparecem com a forma mais ou menos redonda e constituida de duas partes, uma homogenea quasi descorada ou corada levemente de azul e uma granulosa corada em vermelho-violete (azulofila). As granulações algumas vezes são reunidas em um ponto qualquer da plaqueta, algumas vezes excentricas, outras vezes centrais, em alguns casos são irregularmente esparsas sobre a parte descorada, especialmente nas plaquetas volumosas.

A morfologia da plaqueta é essencialmente identica, tanto com metodos a fresco como sobre preparados a seco, corados com o liquido de Giemsa; se uma diferença existe, é que com a coloração vital as



Preparação segundo o metodo de Fonio, mostrando diversos globulos vermelhos e dois hematoblastos. (Microfotografia original) granulações do cromomero tendem mais a se reunirem e a diferenciarem excentricamnete da parte hialina, emquanto que nos preparados fixos a parte cromatica é geralmente mais difusa. Alguns autores, pelo fato da coloração violeta do cromomero com o Giemsa, querem notar naqueles o valor morfologico de um nucleo.

Mas, como observa justamente tambem Pappenheim, nem tudo que se córa de vermelho violete com o Giemsa, é substancia nuclear. Basta olhar para as granulações azurofilas do linfocito do sangue circulante e dos mieloblastos. Contra a hipotese da natureza nuclear do cromomero, está o fato de que esse não se córa com o verde de metilio com a hemateina e com a hematoxilina. As recentes pesquisas de Roskin e Grundbaum com o fim de determinar a natureza das granulações do cromomero feita com a tão anunciada reação nucleo-proteica de Feulgen, com resultados negativos, tende sempre mais a excluir a natureza nuclear do cromomero mesmo.

Um fato assas interessante vem pôr em claro desde Aynaud, com a demonstração da grande resistencia das granulações das plaquetas coraveis com o Giemsa. Esses fatos podem ser demonstrados com os fixadores mais diversos como o calor, o alcool, o sublimado, o acido cromico, acido picrico, a formalina.

Vaí anotado, porém que se as plaquetas demonstraram quasi sempre a mesma morfologia pura, usando fixadores assaz diferentes, esses modificam um pouco seu volume após os varios processos adotados para a fixação. Pappenheim teve ocasião de demonstrar que a plaqueta fixada após o dessecamento no ar tinha um volume maior que a fixada sobre preparados humidos mediante o acido osmico. Isto explica indubitavelmente a divergencia que

existe entre alguns autores sobre as dimensões das plaquetas.

Cesaris-Demel, além das plaquetas normais, dis-

tingue os seguintes 4 grupos:

- I Plaquetas muito menos volumosa, algumas vezes gigante, constituida só pela parte hialina (hialomero) corada debilmente de azul e na qual não se encontra nenhuma granulação azurofila.
- II Analoga forma com uma ou pouquissimas granulações azurofilas.
- III Grande massa arredondada sem contorno hialino, finissimamente ponteado de numerosas granulações azurofilas e com diferenciação periferica de verdadeira e propria plaqueta.
- IV Fragmentos de protoplasma (com granulações azulofila) não mais arredondado, mas da mais diversa forma, de pera, de clava, mais ou menos alongada, de bastão, de filamento, cercado de hematoblastos a ele aderentes.

R. Stahl, distingue plaqueta de forma e grandeza normais e anormais. Dá grande importancia á diferença entre forma madura e não madura que chama de tromboblastos. Estes distinguem-se pela forte basofilia do hialomero. Foram demonstradas numerosas formas de transição entre o tromboblasto e a plaqueta madura. O criterio da fina particularidade morfologica da plaqueta vem demonstrado segundo Stahl, não com solução de sulfato de sodio, mas nos preparados comuns, córados com o Giemsa.

Vassaturo submetendo aos vapores de iodo os

preparados em esfregaços e usando como substancia de imersão o xarope de levulose, estudou a morfologia da plaqueta tanto no sangue circulante como nos órgãos hematopoéticos: a plaqueta aparece como elemento constituido de uma substancia basica corada de amarelo claro, na qual se instalam faculas enegressidas, pardas, que em nenhum outro elemento se encontram a não ser no protoplasma do megacariocito adulto com diferenciação hematoblastica. Nota, além disso, que ao lado dos hematoblastos portadores de facula gigantesca, outras não os ha.

Seguindo o parecer de Schilling e Stahl, Vassaturo distingue a plaqueta verdadeira da falsa. Esta ultima é formada tambem de pseudopodios arrancados á gigantesca celula medular. Sobre isso releva notar que os hematoblastos dotados de facula, devem ser os verdadeiros hematoblastos. Os outros, denominados por Naegeli de formas em salsicha, por Stahl de hematoblastos patologicos, correspondem ás destituidas de facula.

O diametro das plaquetas é muito variavel. Em geral muito maior em estado seco do que no sangue puro ou preparado com auxilio dos liquidos fixadores. Devido é isso, sem duvida, a que a dessecação se opõe á retração que sofrem no sangue puro ou liquidos de diluição. As menores, sempre excepcionais, medem pouco mais de dois micros. As maiores medem cinco micros, podendo atingir cinco micros e meio e mesmo 5 micros75, sem perderem os caracteres particulares. Entre esses extremos acham-se todos os intermediarios. As plaquetas de um diametro medio abundam e medem de 3 a 3 micros e meio.

#### CAPITULO III

#### **GENESE**

— Sobre a genese e sobre o significado morfologico das plaquetas sanguineas, ainda existem presentemente numerosas teorias contraditorias: os hematologistas estão na maioria concordes em aceitar como indiscutivel a real preexistencia da plaqueta no sangue circulante, como já Bizzozero luminosamente demonstrára, excetuando poucos, entre os quais Marino, Pianese, Woldbridge e Mathews.

Com relação á natureza e á genese das plaque-

tas, fica a discutir:

 Se as plaquetas preexistem no sangue normal;

Se são verdadeiros hematoblastos (progenitores dos eritrocitos) como quer Hayem;

c) Se são celulas independentes e capazes de viverem e de se reproduzirem motu proprio.

- d) Se têm origem multipla, seja dos eritrocitos, dos leucocitos ou dos endotelios;
- e) Se são produtos de derivação dos leucocitos;

f) Se são derivados dos eritrocitos;

g) Se são produtos de derivação dos megacariocitos.

#### a) Preexistem as plaquetas no sangue normal?

Entre os que ainda recentemente não admitiam a preexistencia das plaquetas no sangue está Pianese. Segundo este autor, no sangue contido no espaço de uma veia isolada entre duas ligaduras, lesada de qualquer modo, pelos causticos ou pelo resfriamento, comparam-se e confrontam-se as plaquetas de grande comprimento, achando-se esta em numero superior ás existentes no sangue do mesmo espaço (trato da veia homonima integra, isolada entreduas pinças hemostaticas).

Resultados analogos obter-se-iam tambem, quando entre tratos de veia isolada se introduzem pouquissimas gotas de solução citrosodica. Pianese conclue ser sua amadurecida opinião, não existirem em vasos integros plaquetas preformadas no sangue normal circulante. Insiste, ao envês que as plaquetas se formam em condições presupostas analogas ao mecanismo genetico da fibrina.

Tambem para Mathews e Wolbridge as plaquetas, em parte pelo menos, encontram-se em solução no plasma. Segundo Mathews, o plasma do sangue seria uma especie de protoplasma diluido, no qual se acham em estado de equilibrio instavel por supersaturação, enzimas, proteinas, sais de calcio e lipoides (fosfolipina), e que por especial condição aí se determina a formação de cristais liquidos, alguns dos quais seriam as plaquetas.

De resto, tambem Schwalb admitira a produção de plaquetas em tratos de vasos ligados, conclusões que não foram confirmadas por outros observadores, entre os quais Aschoff.

Polettini repetindo a classica experiencia de Bizzozero sobre a asa de morcego, reafirma e demonstra que as plaquetas preexistem na circulação. Realizando outras rigorosas pesquisas, não consegue confirmar a produção de plaquetas no sangue contido em segmentos de vasos compreendidos entre dois laços (como sustenta Pianese), concluindo que é sempre possivel distinguir as plaquetas dos produtos de alteração ou de desagregação naturais ou artificais de outros elementos hematicos.

#### b) Teoria hematoblastica

Hayem admitia que as plaquetas (hematoblastos) seriam capazes de se transformarem por fases na etapa final, a hematia.

Vejamos a seguir, como Hayem chegou a tal conclusão:

— No recem-nascido humano, o estado do sangue indica ativa formação de hematias. Esta epoca da existencia é marcada nos vertebrados por fenomeno importante, que consiste, na produção de elementos sanguineos da serie hemoglobinica, nos vasos em formação. O fato observa-se nas membranas transparentes podendo tambem se produzir em outras partes do organismo.

Ranvier descobriu essas neoformações no epiploo do coelho e do gato recem-nascido. Em manchas leitosas do grande epiploo do coelhos de uma a seis semanas, Ranvier reconheceu a presença, no meio de globulos brancos e de corpusculos de tecido conjuntivo, de elementos analogos aos descritos por Wissozky nas membranas do embrião de coelhos. Esses elementos, aos quais Ranvier deu o nome de celulas vaso-formadoras, são destinados a produzirem "in loco" novos vasos. Contêm no protoplasma globulos vermelhos comuns, não nucleados, que parecem tomar aí nascimento espontaneamente. Mais

tarde, esses vasos, depois de terem formado uma rêde mais ou menos complicada unem-se com os vasos anteriormente desenvolvidos para completar a vascularização da membrana. Ranvier encontrou elementos analogos, mais simples e menos abundantes no epiploo de gato recem-nascido.

Pesquisas feitas por Hayem, em cobaios, gatos e coelhos, permitiram reconhecer a exatidão da descrição de Ranvier e verificar que nesses elementos existem, ao lado das hematias, numerosos hematoblastos. É no gato recém-nascido que se observam as formas simples das celulas vaso-formadoras. Esses elementos são pouco numerosos, mas bem isolados e não mascarados em parte, como nas manchas leitosas do epiploo de coelho, pelos corpusculos conjuntivos e globulos brancos. Asemelham-se a grandes celulas linfaticas, em geral com um só nucleo, que não tardam a tomar a forma de um fuso. Na parte entumescida do protoplasma, observa-se certo numero de globulos vermelhos que se agrupam frequentemente num espaço que se vai tornar vascular. Mais tarde, essas celulas alongam-se para tomarem a aparencia de cilindros de ramos multiplos, denominada rêde vaso-formadora, pelo histologista Ranvier. Na superficie dessa rêde são aplicados alguns corpusculos de tecido conjuntivo. Mas o fato mais importante, consiste na presença de globulos vermelhos, já visiveis na parte protoplasmica que mais tarde será o canal vascular. Ranvier reconheceu que se trata de globulos vermelhos não nucleados, ao lados dos quais não se observam globulos brancos. Schaeffer encontrou no tecido conjuntivo sub-cutaneo de jovens ratos, celulas mais ou menos cheias de globulos vermelhos. Hayem levou esses estudos mais adiante, fazendo vêr que o globulo vermelho não apareceu de

inicio. Poude, com efeito, averiguar no protoplasma das celulas vaso-formadoras, ao lado de globulos vermelhos nitidamente hemoglobinicos, completamente desenvolvidos, certo numero de hematoblastos, geralmente mais numerosos do que os globulos vermelhos.

Para observar esse fato examinou no microscopio, em sôro iodado, em que deixou evaporar o excesso de iodo, um fragmento de epiploo, retirado de um gato recém-nascido. Notou nos elementos vaso-formadores, não sómente globulos vermelhos de diversas dimensões, mas igualmente corpusculos, de aspeto ceroide, mais volumosos e mais refringentes do que as granulações protoplasmicas. Esses corpusculos têm exatamente os mesmos carateres que os hematoblastos do sangue geral. O mesmo modo de formação do sangue nas celulas vasos-formadoras, foi observado por Hayem em 1915 nos passaros especialmente em pintos de 10 - 20 dias.

O primeiro estado da celula vaso-formadora é um elemento muito alongado, cheio, finamente granuloso, terminado por tres pontas, uma das quais continua com outro elemento identico.

O referido elemento contém um nucleo ovoide e, bastante longe dele, pequena celulas que não é sinão um hematoblasto em via de desenvolvimento. O outro elemento que está unido por um dos pontos como o anteriormente descrito, apresenta uma fase mais adeantada do desenvolvimento. Encontra-se já nele além do nucleo um pouco maior, varios hematoblastos. Não se observam ainda globulos vermelhos. E assim, sucessivamente, as celulas denominadas vaso-formadoras, vão se desenvolvendo, e em parte excavadas em forma de capilares, que contêm hematoblastos e hematias. A parede é forrada na

parte canalizada por algumas celulas chatas, conjuntivas.

Os hematoblastos apresentam-se nessas preparações sob o aspeto de celulas incolores, que contém um nucleo muito corado, relativamente bastante grande. Os globulos vermelhos são tambem mais ou menos volumosos. São bem fixados e corados fracamente pela eosina. Esses fatos estabelecem que a produção dos globulos vermelhos nas celulas vaseformadoras faz-se da mesma maneira em toda a serie dos vertebrados, o que demonstra mais uma vez, a identidade existente entre os hematoblastos de aparencia corpuscular e os hematoblastos da forma celular com nucleo visivel. Havem não observou nos nucleos das celulas vaso-formadoras, figuras que podem explicar o nascimento dos elementos surgidos, no protoplasma. Ha um processo que escapa, diz, Hayem, uma creação celular, que não corresponde a fenomenos conhecidos. Mas o estudo das celulas vaso-formadoras das membranas vasculares de animais jovens permitiu a Havem pensar que uma parte importante do sangue de embrião, se forma ao mesmo tempo que os vasos. E, poude induzir que, mais tarde, depois de terminado o desenvolvimento dos vasos, continuem, talvez, a participar da formação dos elementos vermelhos do sangue.

Durante um tempo bastante longo e até o nascimento, em muitos animais de laboratorio, o sangue contém globulos vermelhos nucleados e anucleados. Segundo Hayem, as duas especies de elementos hemoglobinicos não constituem duas fases sucessivas de desenvolvimento de um mesmo elemento. São dois elementos distintos, tendo cada um origem particular. Os globulos nucleados provém da multiplicação dos elementos formados nos centros de sanguinificação dos órgãos hemopoéticos. As hematias normais anucleadas provêm, durante o periodo de desenvolvimento, das celulas vaso-formadoras, sendo acompanhadas por hematoblastos que representam a primeira forma.

Os elementos nucleados são verdadeiras celulas dotadas de propriedades ameboides, menos hemoglobinicas que as hematias, absolutamente semelhante ás que se observam nos centros dos orgãos hemopoéticos, p. ex., na medula dos ossos. Quando entram no sangue do animal desenvolvido, conservam seu nucleo, durante o periodo embrionario, e é porque em certas circunstancias patologicas, podemos encontra-los depois do nascimento e nos adultos. O nucleo não desaparece por cromatólise. Luzet, em seus estudos nos órgãos hemopoéticos, com auxilio de preparação de figado, baço, medula ossea não encontrou formas de passagem entre a celulas vermelhas e o globulo vermelho. A celula vermelha de nucleo pode-se dividir quando é jovem; mais tarde é suscetivel de envelhecer. Os indices desse estado são a pequenez do nucleo que se córa vivamente e o aumento na proporção de hemoglobina no corpo celular. A atrofia nuclear não ultrapassa nunca um certo grau. Não póde pois ser questão de seu desaparecimento.

Hematoblastos dos passaros. Segundo J. Denys, em cuja opinião durante muito tempo se acreditou, as celulas nucleadas e incolores do sangue dos passaros são eritroblastos provindos no animal desenvolvido, da medula ossea. O fato não está demonstrado. Os elementos incolores do sangue dos passaros (como os dos mamiferos) quer provenham ou não da medula dos ossos, não têm as propriedades dos eritroblastos mas os dos hematoblastos, quer sejam esses nu-

cleados como em todos os não mamiferos ou anucleados como nos mamiferos. Esses hematoblastos têm todos os mesmos caracteres comuns como sejam:

- 1.º A preexistencia no sangue circulante.
- 2.º A alterabilidade desde a saída dos vasos, donde resultam a aglutinação entre si, e a aderencia aos corpos extranhos, as deformações e a dissolução parcial; a necessidade, para observar os caracteres anatomicos, de uma fixação instantanea desde a saída dos vasos.
- 3.º A participação dos elementos na formação do reticulo fibrinoso cuja parte não solubilizada forma os pontos nodais.
- 4.º O paralelismo entre a marcha da coagulação e a alteração dos elementos: efeito inibidor das temperaturas baixas, sobre a evolução regressiva dos hematoblastos durante a coagulação do sangue ao mesmo tempo que o retardamento do fenomeno. Extração por batedura do sangue, dos hematoblastos, como primeiro ato da desfibrinação, consequencia da aderencia aos corpos extranhos.
- 5.º A participação na constituição do sangue, muito maior do que a dos globulos brancos.
- 6.º A produção de uma crise hematoblastica, que consiste em acumulo rapido e consideravel de hematoblastos em todas as condições onde o sangue se regenera, e transformação desses elementos em globulos vermelhos no começo pequenos e irregulares, depois maiors e mais normais.
- 7.º A formação intraprotoplasmica, nas celulas vaso-formadoras, de hematoblastos e depois hematias.

Os caracteres comuns dos hematoblastos são devidos a que sua origem é comum, o que Hayem demonstrou ao fazer o estudo das celulas vaso-formadoras dos passaros. Essas celulas, tanto nos são mamiferos, não são elementos em regressão.

Hematoblastos dos mamiferos — Esses elementos têm as mesmas propriedades que os hematoblastos nucleados dos amamalianos cujo nucleo é perfeitamente coravel e têm todos os caracteres de elementos jovens em via de desenvolvimento. Os hematoblastos dos mamiferos são igualmente jovens, têm origem comum nas celulas vaso-formadoras e manifestam em toda a serie animal propriedades fisiologicas comuns, como vimos acima.

A dificuldade assinalada por Hayem, sem a resolver, é aquela que trata do modo de formação dos hematoblastos. Não se vê, como nascem esses elementos, nas celulas vaso-formadoras. Não se vê, como, mais tarde no adulto, eles se multiplicam. Hayem emite a hipotese de que os hematoblastos têm como ponto de partida um grão de cromatina saído do nucleo da celula vaso-formadora.

No adulto, os hematoblastos, tanto dos mamiferos como dos amamalianos, nunca mostravam divisão.

Hayem acha que depois do nascimento, os hematoblastos pódem ter sua origem em certas partes do aparelho vascular.

Do que acima ficou exposto, Hayem conclue que no adulto como no embrião, encontram-se duas variedades de elementos com hemoglobina.

 a) A variedade normal, de origem hematoblastica, corpuscular nos mamiferos, nucleada nos amamalianos;
 b) A variedade celular nucleada, a mesma em toda a serie dos vertebrados e resultante da passagem no sangue de certos elementos provenientes dos orgãos hematopoéticos (medula dos ossos e algumas tambem de baço no animal desenvolvido).

Os elementos de origem hematoblastica formam a messa normal dos globulos vermelhos do sangue. Estes são entretidos e, á medida das necessidades, regenerados por intermedio dos hematoblastos.

A segunda variedade (b) não aparece no sangue, sinão de maneira discreta e sempre em casos anormais, seja nas anemias consideraveis seja em certos casos patologicos. E em razão da semelhança dos órgãos hemopoéticos em toda a serie dos vertebrados, esses ultimos elementos são semelhantes ás celulas embrionarias e ficam sem relação com as hematias da idade adulta.

### c) São as plaquetas celulas vivas e independentes?

Deetjen, Kopsch, Argutinsky, Bürcker, Rosin e Bibergeil e Morawitz, Achard e Aynaud, admitem que as plaquetas sejam celulas independentes e capazes de vida. Fóa pensava que no baço existisse uma especie de centro germinativo para a plaqueta, atualmente, porem, aceita a teoria de Wright. Mondino e Sola haviam descrito nas plaquetas figuras de cariocinese.

Novas contribuições para a hipotese da natureza independente das plaquetas, trouxeram recentemente Sacerdoti, Le Sourd, Pagniez, Cole, Chevrel e Roger.

Sacerdoti conseguiu imunizar um animal contra as plaquetas de um animal de outra especie.

O soro antihematoblastico manifesta claramente a qualidade especifica "in vitro", determinando a aglutinação das plaquetas levadas e conservadas em solução de citrato e cloreto de sodio. Mais brilhantemente manifesta-se, se for injetado na circulação porque então determina o desaparecimento completo das plaquetas do sangue circulante.

Fatos analogos foram observados por Le Sourd e Pagniez, Cole, Chevrel e Roger.

Por outro lado, Achard e Aynaud, teriam demonstrado movimentos e mudança de forma, sob a influencia do calor, no sangue do asno, com tecnica especial. Esses autores admitem de modo absoluto a independencia das plaquetas das outras celulas do sangue. Esses resultados verdadeiramente interessantes e notaveis, não são por emquanto tais que facultem conclusões definitivas acerca da genese das plaquetas. Sacerdoti, mesmo, admite que a demonstração de anticorpos específicos produzidos pelas plaquetas demonstra-lhe só a diversa natureza quimica, mas não póde excluir a eventual relação genetica com os eritrocitos e com os leucocitos. Comtudo, reconhecendo a importancia dos fatos, ora recordados, não parece por emquanto aceitavel a hipotese da natureza celular das plaquetas. Com efeito contra tal hipotese póde-se opôr a seguinte objeção, fruto de numerosas pesquisas de autores diferentes:

— Toda celula de metazoario tem um nucleo e um protoplasma de estrutura bem definida com reações tintoriais sempre iguais. O nucleo córa-se com cores basicas, de um modo eletivo com verde de metilio. Ora, a parte das plaquetas que corresponde ao nucleo não toma o verde metilio. Córa-se é verdade com o metodo de Romanowsky-Giemsa, de modo analogo á substancia do protozoario. Mas tais colorações encontram-se tambem em outros elementos que não são inteiramente nucleos celulares (granulações azulofilas dos linfocitos do sangue, mieloblastos da medula ossea, p. ex.). A disposição, pois, da parte

central, pseudo cromatica das plaquetas apresenta-se sob a forma de pequenos granulos inteiramente independentes, uns dos outros, onde já não se encontram traços de membrana nuclear, como teremos ocasião de recordar nas plaquetas gigantes. A parte cromatica é constituida de granulações irregularmente esparsas em todo o corpo da plaqueta. Convem no emtanto lembrar ainda que as pesquisas de Grawitz e Grüneberg demonstraram que as granulações azulófilas das plaquetas se deixam atravessar pelos raios Muitos outros argumentos poder-seultravioletes. iam trazer contra a opinião de quem sustenta a natureza celular independente das plaquetas, baseada sobretudo na pretensa natureza nuclear do cromomero. Recordaremos sómente que, Weidenreich fazendo agir uma solução acetica no sangue, demonstrou que a parte granulosa ou cromomero se dissolve. fala evidentemente contra a natureza nuclear da parte cromemera das plaquetas.

Os fatos ora expostos, permitem, por emquanto aceitar com grande dificuldade a hipotese da estrutura celular independente das plaquetas, no sentido de Deetjen, Achard e Aynaud apesar das pesquisas de Sacerdoti e dos autores acima referidos, atribuindo ás plaquetas estrutura quimica diversa da dos eritrocitos. Embora exista ainda as experiencias de Achard e Aynaud que demonstraram movimentos e mudanças de forma das plaquetas sobre a influencia do calor, considerando-a como a verdadeira expressão de atividade vital propria. Vai recordado pois, como justamente observou Schwalbe, que a pretensa cariocinese verificada por Mondino e Sola não foram confirmadas por nenhum pesquisador (com exceção de Spadaro).

A. Perroncito em uma serie de pesquisas muito

diligentes, não aceita a doutrina de Wright, sobre a genese das plaquetas dos megacariocitos. Admite a possibilidade de que, no plasma citratado, as plaquetas sejam capazes de reproduzirem-se por formações de novas plaquetas das preexistentes.

Perroncito não exclue a possibilidade de ser ocromomero uma substancia muito analoga á cromatina nuclear.

De qualquer modo, segundo Perroncito, as plaquetas seriam celulas transformadas e independentes dos outros elementos do sangue circulante.

# d) São as plaquetas elementos de origem variavel multipla, dos eritrocitos, dos leucocitos e eventualmente do endotelio vasal?

Poucos autores pensam que as plaquetas possam ter origem multipla, tanto dos eritrocitos como dos leucocitos.

Si se mantem, como aceitam a maior parte dos hematologos, constante a estrutura das plaquetas, como havia sido descrito, permanece pouco sustentavel a hipotese de que essas possam ter origem multipla, de celulas fortemente disparates, como os leucocitos e os eritrocitos. Se a plaqueta, seja em condições normais como patologica, seja de grande como de pequenas dimensões, é sempre reduzivel a uma unidade morfologica (cromomero e parte homogenea) dado que se deseja aceitar a sua genese de alguma celula do sangue, parece mais provavel que essas derivam de uma especie unica e sempre daquela e não de varios tipos diferentes, sendo sempre identico ao produto terminal.

## e) São as plaquetas derivados dos leucocitos?

Entre os que admitem a genese das plaquetas dos leucocitos, são especialmente de recordar-se Lilienfeld, Howel, Neumann, Gabritschwsky, Schulze, Riess, Ross, Decastello e Krjukoff.

Howel, admite a destruição dos leucocitos no sangue e crê que as plaquetas sejam derivadas deles. Idéas analogas tem Gabrietschewsky e Maurel. Este ultimo afirma ter observado o desenvolvimento das plaquetas a expensas dos globulos brancos, observando-os no sangue aquecido em dispositivo adequado. Lilienfeld admite que contenham nucleina e sejam derivados leucocitarios, assim tambem Schittenhelm e Rodong. Como é facil vêr, a maior parte dos autores admitem a genese leucocitaria das plaquetas, baseados em uma eventual presença de residuos nucleares dos leucocitos. Mas o pretenso residuo nuclear das plaquetas, se bem se coram fracamente com as cores nucleares, como a hematoxilina e o azul de metileno, não se coram inteiramente com o verde de metilio. Cora-se, é verdade com o Giemsa, mas o Giemsa, põe, como é notorio, em evidencia muitas granulações que não têm nenhuma relação com a substancia nuclear.

Decastello e Krjukoff afirmam que as plaquetas derivam do citoplasma dos leucocitos e por isso apresentam constituição diversa, segundo o tipo do qual derivam. Assim, para ditos autores, existem plaquetas eosinofilas, mastzellenplaquetas e plaquetas basofilas com granulações azulofilas.

É possivel objetar a essa maneira de vêr, que se as plaquetas oferecem depois de coloração pelo Giemsa uma reação basofila na sua parte hialina e uma reação azulófila na sua parte granulosa, não apresen-

ta nunca, mesmo parcialmente, as reações caracteristicas dos grãos neutrofilos ou eosinofilos, nem metacromaticos. (Ferrata). Tambem Riess admite a origem leucocitaria das plaquetas, considerando-as na sua maior parte constituidas de uma substancia semelhante ás nucleohistonas dos globulos brancos.

## f) São as plaquetas derivadas dos eritrocritos?

Muitos hematologistas, entre os quais Arnold, Weidenreich, Maximow Wlassow, Guarnieri Daddi, Preisich, Heim, Vasale, Pappenheim, Samele, Fotti, Schlling etc., admitem a origem eritrocitica das plaquetas.

Podem-se agrupar as teorias sobre o mecanismo de derivação das plaquetas dos eritrocitos em tres tipos:

- 1.°) como um produto de eritrorrexé e da eritrosquéxe (Arnold e sua escola, Weidenreich).
- 2.°) como derivadas do corpo interno nucleoide (Bremer, Pappenheim, Maximow, Hirschfeld, Preisich e Heim, Grawitz, Winigradow e Schilling).
- 3.°) como derivados do globulo vermelho inteiro, em via de involução (Vasale, Fotti).
- 1.°) As plaquetas como produto da eritrorrexé e da eritrosquéxe. Arnold certamente descreveu como plaquetas, produtos de destruição por plasmorrexé dos eritrocitos que nada têm de vêr com as verdadeiras plaquetas. Assim tem presentemente pouca importancia as pesquisas de Schwalbe e Solley, os quais colocaram a genese das plaquetas em relações com os eritrocitos granulosos.

Tambem as pesquisas de Dettermann fazendo derivar as plaquetas da gemulação dos eritrocitos, não são mais aceitaveis, tanto mais que foram feitas "in vitro", mantendo o sangue á temperatura de 37°, onde, como demonstram as pesquisas de Aynaud caso não seja o plasma estabilizado (com citrato ou oxalato) as plaquetas destroem-se com grande facilidade.

Weidenreich faz derivar as plaquetas dos produtos de desprendimento da parte periferica (membrana) dos globulos vermelhos. Estes produtos de desprendimento achar-se-iam livres em condições normais e seriam providos de pigmentos hemoglobinicos (färbige Plättchen) pigmentos em seguida perdidos, formando-se no interior a parte granulosa da plaqueta.

Para confirmar esta hipotese, Weidenreich recorda que já nos globulos vermelhos se encontram em alguns casos, degeneração granulosa do protoplasma (granulações basofilas), existindo talvez relação entre as granulações basofilas dos globulos vermelhos e ocromomero (massa granulosa) das plaquetas.

Como observa Pappenheim, entre as granulações basofilas dos eritrocitos e a massa granulosa das plaquetas não existe a mais longiqua relação. De fato, antes de tudo, excetuando Grawitz, Weindeirech, Bloch e Ullmann, ninguem mais julga que as granulações basofilas dos eritrocitos sejam o indice de um processo degenerativo dos globulos vermelhos maduros. A presença das granulações basofilas nos globulos vermelhos do sangue embrionario (Engel, Naegeli, Ferrata), demonstram conjuntamente com muitas outras considerações notadas pelos hematologistas, que essas são proprias do globulo vermelho jovem.

Poder-se-á discutir, talvez ainda, se essas são de origem nuclear ou protoplasmatica. Não ha todavia duvida sobre si representam degeneração da celula. Mas, a parte essa questão prejudicial, vai recordado que as reações cromaticas das granulações basofilas e

da parte granulosa das plaquetas são completamente diferentes. As granulações basofilas córam-se de vermelho com a pironina emquanto o cromometro das plaquetas assume, assaz mal, está côr. Córando com o metodo de May-Grünwald-Giemsa, segundo Pappenheim (as granulações basofilas dos eritrocitos córam-se de azul, a massa cromatica das plaquetas em vermelho-azul.

É bem verdade que tambem em alguns eritrocitos se encontra com relativa frequencia um corpusculo redondo, corato de vermelho com o Giemsa. Mas
esse corresponde ao corpo de Jolly, e é, sem duvida,
o ultimo residuo da cromatina nuclear. Logo, sintoma de juventude, não de degeneração, dos eritrocitos e, manifestando-se assaz diverso do cromemoro
das plaquetas.

Por todas essas razões, a relação que Weindenreich queria vêr entre granulações basofilas e a parte cromatica das plaquetas não podem ser admitidas.

É todavia contrario á hipotese de Weindenreich o fato de que nos casos de plaquetose acentuada, os microcitos que corresponderiam ás plaquetas corados de Weindenreich, não são tão numerosos.

Demais, se com a hipotese de Arnod e se Weindenreich, pode-se ainda interpretar a genese das plaquetas de pequena e media dimensões, não é, inteiramente posivel averiguar a presença no sangue de plaquetas grandes como os eritocitos e com estes perfeitamente redondas. Como essas plaquetas volumosas se acham frequentemente nos casos de cloro-anemia e de leucemia, de anemia malarica, perniciosa progressiva, cumpriria admitir pelo menos para essas, genese diversa, não sendo facil classifica-las como derivados dos esquistocito. Tambem Achard e Ay-

noud criticam e julgam insustentavel a doutrina de Arnold e Weindenreich.

2.°) As plaquetas como derivados do corpo interno nucleoide — Lavdowsk, Pappenheim, Maximov, Preisich e Heim, Somele, recentemente ainda Grawitz, admitem que as plaquetas preexistam dentro do globulo vermelho (nucleoide Innenkörper), tornandose plaquetas livres ao sairem dos globulos vermelhos.

Tambem para Schilling, as plaquetas são restos nucleares dos globulos vermelhos. Essas não se encontram, no vivo, livres no sangue circulante e seriam demonstraveis no interior dos eritrocitos, mediante métodos especiais de fixação rapida. A tecnica comum liberta-o dos globulos vermelhos e o faz passar no plasma.

Alguns autores, como Maximow e Pappenheim, têm tambem ilustrado morfologicamente o corpo inteiro nucleoide que sai das plaquetas. Tratar-se-ia de um residuo da substancia nuclear dos eritroblastos, em outros termos, do produto terminal da cariólise intracelular do nucleo (privado de nucleina, segundo Pappenheim).

Não é o caso de lembrar todas as multiplas descrições que foram dadas aos pretensos restos nucleares, no interior dos globulos vermelhos maduros; recordaremos, porém, que muitos autores, entre os quais Negri, Weindemreich, Naegeli, Jolly e Ferrata, pensam que a maioria dos elementos ditos, corpos internos nucleoides (pretensos restos nucleares) dos eritrocitos, sejam produtos artificiais devido aos processos de tecnica. Toda a historia da maturação do eritrocito, demonstra que o nucleo desaparece totalmente.

É certamente verdade que, com a coloração pelo Giemsa, se vê frequentemente nos eritrocitos um corpo, em tudo semelhante ás plaquetas livres, mas se pode afirmar que se trata de verdadeiras plaquetas sobrepostas aos globulos vermelhos (Naegeli Ferrata). Pappenheim, que é, todavia, sustentador da hipotese de que as plaquetas derivam do "nucleoid Inner körper", foi obrigado a reconhecer que, com metodo vital (azul brilhante de cresilio, azul I etc.), não se córa o corpo interno nucleoide, ainda bem que as plaquetas com tal metodo se diferenciem nitidamente nos seus dois componentes, hialomero e cromomero.

Naturalmente existem em alguns jovens eritrocitos em via de maturação, pequenos corpos que se devem interpretar como verdadeiros restos nucleares, mas esses têm propriedades morfologicas inteiramente diversas dos do corpo interno nucleoide. De tamanho mais ou menos apreciavel, são quasi sempre redondos, compactos, homogeneos, corados muito distintamente de vermelho violete com Giemsa. Tais corpos, são a expressão da juventude do globulo vermelho, não parecendo pois aceitavel a hipotese de que existam nos eritrocitos maduros verdadeiros restos nucleares, como querem, entre outros, Petrone, Vassale e Pighini, Loewit e Arnold.

Dos trabalhos que demonstram a presença de restos nucleares no globulo vermelho maduro, é oportuno fazer distinção nitida. Em alguns desses (Howell, Schmauch, Jolly, Weindenreich) vêm descritos corpos, (verdadeiros restos nucleares) no globulo vermelho do sangue embrional e em alguns eritrocitos do animal adulto; em outros trabalhos (Petrone, Pighini) vêm assinalada em todos os eritrocitos adultos uma substancia interpretada por alguns como verdadeiro nucleo permanente (Petrone), por outros como pequeno residuo cromatico circundado de substancia hemoglobigena (Pighini).

Ora, quanto aos trabalhos de Howell, Schmauch, Jolly, Weindenreich pode certamente aceitar-se que consubstanciam verdadeiros corpos existentes dentro dos eritrocitos.

As formações, ás vezes, existentes em todos os eritrocitos do animal adulto descritos por Petrone e Pighini, são consideradas, pelo menos em parte, como artificios de preparação.

Petrone (1913), publicou novas pesquisas, com documentos, da existencia de um nucleoide. Nos globulos vermelhos, tais nucleoides seriam constituidos de paranucleina e demonstraveis graças á ação de fixadores e mordentes assaz disparates. Nem os corpos de Howell, Schmauch, Jolly, etc. têm algumas analogias com os nucleoides Innenkörper, descritos, entre outros, tambem por Pappenheim e Maximow. Correspondem, em vez, ao corpo interno nucleoide, a parte central da substancia hemoglobigena de Pighini e, talvez, alguns dos nucleos descritos por Petrone.

Porém, admitindo contudo que a maior parte dos pretensos corpos internos nucleoides descritos nos eritrocitos do sangue circulante sejam artificios de preparação, não se pode aceitar de todo esta interpretação, depois de algumas pesquisas concordes de Dietrich, Löwitt e Pappenheim. De fato, Löwitt tinha demonstrado nas depressões centrais de alguns eritrocitos de animal adulto um pequeno corpusculo dotado de movimentos. Pappenheim e Dietrich confirmaram o achado, observando sempre o sangue a fresco.

Todavia, convindo com Löwitt, no excluir qualquer relação entre os corpos centrais do eritrocito e as plaquetas, não é pois absolutamente possivel aceitar que aqueles, analogamente ás granulações basofilas, representem uma fase regresiva do globulo vermelho. A hipotese de Löwit que tende a identificar o corpo interno nucleoide com as granulações basofilas é absolutamente insustentavel.

Engel, Naegeli e Ferrata, têm descrito enfim com riqueza de particularidade as granulações basofilas no sangue embrional e nos órgãos hemópoeticos do adulto, em casos de envenenamento experimental com chumbo (Reggiani) e na anemia grave (Naegeli), de modo que querer sustentar ainda a natureza degenerativa das granulações basofilas no sentido de Grawitz, Bloch, Ullmann, Löwitt e Weidenreich, é fazer certamente obra vã. De qualquer modo, após as pesquisas de Löwitt, Dietrich e Pappenheim, o excluir "apriori" a presença de eventual corpusculo central no globulo vermelho não é possivel, isso, porém, em harmonia com quanto tem sustentado Jolly, Naegeli, Fóa, Sacerdotti, Vassale e o proprio Löwitt, não parece tenha relação alguma com a genese das plaquetas.

Decorre, pois, do exposto que a teoria da genese das plaquetas do corpo interno nucleoide não está demonstrada.

3.º As plaquetas como derivados do globulo vermelho inteiro, em via de involução (Vassale). — Vassale introduziu no estudo das plaquetas alguns novos processos de tecnica, conseguindo de tal maneira conservar muito bem a forma original das plaquetas como se vêm a fresco. Baseado em numerosas pesquisas morfologicas e biologicas, Vassale emitiu a hipotese de que as plaquetas representam metamorfose fisiologica regressiva do globulo vermelho inteiro.

Algumas interessantes observações suas, tendem a demonstrar que as plaquetas conservam a forma originaria do globulo vermelho, assim no camelo, que, como se sabe, possue globulos vermelhos de forma eliptica, as plaquetas maiores aparecem preferencialmente elipticas.

Nos outros mamiferos e no homem, pelo contrario, as plaquetas maiores aparecem habitualmente redondas.

Bastante interessante é a constatada presença de bom numero de sombras, corpos semelhantes aos eritrocitos corados em vermelho claro pela fucsina, que Vassale interpreta como formas de passagem entre os globulos vermelhos descorados e as plaquetas que com seu metodo aparece de um belo vermelho vivo.

Vassale capacita-se de que as plaquetas de grandes dimensões sejam de volume igual ao globulo vermelho e algumas vezes aparecem um pouco menores, porque quasi todos os metodos que se usam para o seu estudo, tendem a enrugal-as.

Com o metodo de Vassale, o cromomero das plaquetas permanecem descorado. Vassale, tem o tal cromomero, como residuo da substancia nuclear dos eritroblastos.

Segundo Fotti, as plaquetas gigantes seriam formas de transições entre os eritrocitos e as plaquetas comuns.

## Derivam as plaquetas dos megacariocitos?

Wright (1906) foi o primeiro a sustentar que nenhuma das teorias classicas interpretava de modo persuasivo a genese e a significação anatomica das plaquetas e que o problema devia primeiro ser estudado com novo criterio e com diversos processos.

Wright, com um seu metodo pessoal, fixando as peças com alcool metilico e corando, depois de inclusão em parafina, os cortes com a mistura de Leischmann, demonstrou que as plaquetas são formadas de duas partes: uma granulosa constituida de granulos corados de vermelho violete (cromomero) e a outra, periferica, palida, azul hialina.

Sobre os mesmos cortes fixados e corados com o mesmo metodo, o protoplasma dos megacariocitos na sua grande massa é mais ou menos cheio de pequenas granulações vermelho-violaceas, identicas ao cromomero das plaquetas, limitadas na periferia de uma zona hialina corada de azul.

Sendo a teoria de Wright baseada na genese das plaquetas pelos megacariocitos, julgamos conveniente expor brevemente esse peculiar tipo de celula.

Megacariocito — Na medula ossea e tambem em outros órgãos hemopoeticos (baço), especialmente de alguns animais, encontra-se um tipo de celulas ordinariamente muito volumosas, de contornos algumas vezes regular e outras pseudopodios que com frequencia se acham proximos aos vasos. O nucleo, muito volumoso, oferece formas irregulares mamilares, dispondo-se a cromatina em reticulo de filamentos grossos que limitam espaços mais claros.

Tais elementos, denominados megacariocitos, ou celulas gigantes medulares, estudados por Howell e Bizzozero, têm sido objeto nesses ultimos anos de longos e pacientes estudos, sobretudo a importancia que esses elementos têm tido na genese das plaquetas.

As indagações de V. der Stricht, Von Kostanecke, Heindenheim, Bizzozero, Maximow, Pappenheim, Ferrata, demonstraram na medula ossea a origem dos megacariocitos da celula com protoplasma basofilo de estrutura nuclear semelhante á hemocitoblastica. Estas hipertrofiam o protoplasma, emquanto o nucleo aumenta de volume e começa a lobar-se por di-

visão direta. Tambem é de admitir-se a divisão mitotica, si bem que mais rara, divisão esta, descrita por muitos autores como Verson, Ferrata, Maximow, Levy.

Recentemente, Locatelli observou em cobaios afetados de tripanosomóses, quantidade verdadeiramente consideravel de mitoses nucleares de megacariocitos, em que os nucleos apresentam todos os estados da divisão cariocinetica, desde a prófase até a metáfase. Locatelli tambem observou sempre nas mesmas condições experimentais, a possibilidade de multiplicação dos megacariocitos por divisão direta. Não raro contudo, os nucleos, aumentado de volume, permanecem monomorficos.

Segundo Di Guglielmo, os megacariocitos originam-se dos policariocitos, por fusão nuclear, formando-se estes ultimos por reagrupamento sincial e fusão protoplasmatica de dois ou mais elementos celulares ditos prepolicariociticos.

Muitos megacariocitos apresentam modificações do protoplasma pelo aparecimento de pequenos grupos de granulos que assumem aspeto morfologico muito semelhantes aos apresentados pelas plaquetas no sangue circulante. Tais granulações foram descritas pela primeira vez por Schridde.

Os megacariocitos, com relação a sua morfologia, são distinguidos em megacarioblastos (linfoides com nucleo hemociblastico) megacariocitos linfoides (com nucleo megacariocitico e protoplasma basofilo) e megacariocitos granulosos (azulófilos) ou plaquetoblastos. Todos essas fomas encontram-se, em quantidade maior ou menor em cada medula ossea normal.

As relações dos megacariocitos com os vasos, são sobremaneira importantes e explica-nos, como em

consequencia da degeneração fisiologica a que se submeteram os megacariocitos na medula ossea, os nucleos picnoticos passam no sangue circulante no coração direito, reencontrando-se no pulmão sob forma de embolos. Dos pseudopodios ricos de granulos azulofilos dos megacariocitos destacam-se pedaços de protoplasma que no sangue circulante se transformarão em plaquetas.

Em condições fisiologicas podem-se encontrar nos pulmões não só os nucleos dos megacariocitos mas tambem a celula integra no seu protoplasma (Aschoff, Maximow, Lubarsch e Lany). No sangue circulante, em algumas hemopatias e sobretudo na leucemia granulocitica passam na circulação os megacariocitos em função plaquetoblastica com caracteres ainda bem reconhecivel seja no nucleo como de protoplasma (Delhofen, Naegeli, Kaznelson, G. Minot, Di Guglielmo, Cesares Demel, A. Fontana, Vasatura etc.) Goroncy consegue demonstrá-los também nos glomerulos do rim.

Recentemente Svend Petri, em pesquisas ana tomicas sobre tres casos de leucemia, encontrou a notavel quantidade de megacariocitos nos vasos perifericos de varios órgãos e tecidos, especialmente nos capilares do rim e do pulmão.

Eis em esquema a genese dos megacariocitos e das plaquetas:

Hemoistioblasto

→ Megacarioblasto

Megacariocito linfoide

Megacariocito granuloso

Plaqueta.

A função fagocitaria dos megacariocitos apresenta vivo interesse. É admitida pela maioria dos autores apezar de encontrar fortes opositores.

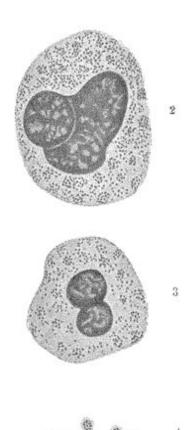
Resumindo, poder-se-ia considerar os megacariocitos como celulas constantemente presentes no tecido mieloide destinado a funções em parte conhecidas e em parte desconhecidas. Os megacariocitos em condições normais não se encontram na circulação. Participariam da formação dos elementos morfologicos do sangue, produzidos através de diferenciações e avulsões de fragmentos do protoplasma, que constituiriam as plaquetas do sangue circulante.

Eis os principais argumentos que falam em favor da teoria de Wright:

- 1.º As celulas gigantes perdem protoplasma. Está isto demonstrado pela presença de formas com escasso protoplasma e de celulas constituidas exclusivamente pela massa nuclear. A perda do protoplasma é devida ao desprendimento dos pseudopodios.
- 2.º O numero das celulas gigantes e dos pseudopodios onde se nota a formação das plaquetas, constitue pequena parte em confronto com o numero total dos megacariocitos, estando em relação numerica com as plaquetas.
- 3.° —A parte hialina periferica do protoplasma da celula gigante, apresenta movimentos que Deetjen demonstrou existirem na zona periferica das plaquetas.
- 4.° As plaquetas encontram-se só nos animais que têm megacariocitos.
- 5.° As plaquetas comparecem no sangue embrional, só depois que aparecem os megacariocitos.

#### Genese do hematoblasto (Teoria de Wright)





Megacariocito.
 e 3 — Megacariocitos granulosos.
 Hematoblastos. (In Ferrata.)

6.º — Existe relação numerica entre megacariocitos e plaquetas em condições patologicas.

Na anemia perniciosa e na leucemia linfatica observa-se escassa quantidade de plaquetas no sangue e contemporanea diminuição dos megacariocitos na medula ossea, em quanto na leucemia mielogena as plaquetas estão aumentadas e também os megacariocitos.

Tendo Wright, em seus trabalhos, dado grande importancia á zona granulosa perinuclear dos megacariocitos, descrita por Schridde, este autor resolveu controlar as pesquisas de Wright. Mas Schridde não conseguiu convencer-se da verdade da nova doutrina. Devemos, no entanto, recordar que suas pesquisas se referem exclusivamente a material humano tirado de cadaveres.

Em 1912, Ogata, sob a direção de Schridde publicou um trabalho de contróle. Demonstrou os megacariocitos nos tecidos, fixando-os em formalina durante 24 horas. Daí, deixou-os por 12 horas no liquido de Müller, córando depois os cortes com o metodo de Schridde (Giemsa-acetona).

O material de estudo refere-se a animais normais (coelhos, gatos, ratos) e animais tornados anemicos (coelhos) e animais infectados com culturas de estafilococos. Estudou sómente os megacariocitos do rim e do figado de um homem leucemico. Dos embriões de coelho estudou só o figado. Ogata aceita as idéas de Wright e afirma que tambem nos embriões, os megacariocitos formam as tipicas plaquetas, concluindo que as plaquetas, são partes plasmaticas destacadas dos megacariocitos e que a parte interna granulosa das plaquetas (cromomero) corresponde aos granulos descritos por Schridde no interior do protoplasma dos megacariocitos. Antes de Ogata, Bunting (1909), em estudo complexo, não confrontou nenhum paralelo entre as modificações numericas das plaquetas e dos eritrocitos, em quanto que em seguida á injeção de saponina, poude demonstrar relação entre megacariocitos e plaquetas.

Bunting conclue que as plaquetas formam um grupo de elementos com estrutura uniforme de origem comum e que existe perfeito sincronismo entre o aumento no numero de plaquetas no sangue circulante e o dos megacariocitos da medula ossea. Após a formação das plaquetas com o desprendimento dos pseudopodios dos megacariocitos, a celula gigante fica formada só pela massa nuclear. Segundo Bunting, pois, os megacariocitos são os progenitores das plaquetas.

Contribuição, aliás indireta, trouxe Devenko (1910) em interessante estudo das plaquetas no trombo. Não conseguiu demonstrar nenhuma relação entre os eritrocitos, leucocitos e plaquetas, que o autor inculca como preformados no trombo e não originarem-se por produto de destruição dos elementos hematicos circulantes.

Le Sourd e Pagniez obtiveram resultados analogos aos de Wrigth e de Ogata confirmando de tal modo a genese megacariocitica das plaquetas.

Downey (1913) traz nova contribuição á doutrina de Wright concluindo que os megacariocitos são as unicas celulas que contêm granulos semelhantes ás plaquetas e que esses só são os geradores das plaquetas do sangue. Depreendeu tambem que nos cortes de medula é possivel demonstrar a fase intermediaria de desenvolvimento das plaquetas pelos megacariocitos e que com toda probabilidade a formação dos granulos azulófilos do protoplasma dependeria pelo menos, em parte, da modificação degenerativa do nucleo, em outros termos, alguns desses são de origem nuclear.

Brown admite, todavia, que os megacariocitos representam a principal fonte produtora das plaquetas do sangue normal, mas que ainda desse modo as formas ditas de passagem (monocitos) do animal adulto representam promegacariocitos que podem, em casos de excesiva exigencia de plaquetas participarem de sua produção. Este comportamento do monocito, segundo Brown, representaria uma volta ao estado embrional onde os megacariocitos circulantes primitivos correspondem morfologicamente aos grandes monucucleares e a formas de passagem de Ehrlich (monocitos).

Ainda S. Klein (1914), mostra-se partidario da doutrina de Wright. Não sómente quanto á genese das plaquetas do protoplasma das celulas gigantes, mas ainda diretamente do protoplasma do mielogonio (o mielogonio de Klein corresponde certamente aos hemocitoblastos e mieloblastos de Ferrata).

Aschoff, Naegeli e, agora tambem Schridde, aceitam como definitiva a doutrina de Wright, que encontrou na Italia, sustentadores autorizados como Fóa (1912) Cesaris-Demel (1914) e em seguida Ferrata e Di Gugliemo.

Cesaris-Demel usou o metodo de May-Grümvald-Giemsa para córar esfregaços de medula ossea de animal normal, tornado anemico com injeção de piridina, segundo a indicação de Ferrata. Descreve com largueza de particularidade o protoplasma granuloso, azulofilo dos megacariocitos e a formação no interior desses, especialmente nos pseudopodios, de massas semelhantes ás plaquetas.

Cesaris-Demel demonstrou também no baço de gato jovem (onde a plaquetose é sempre muito nitida) ou no baço do mesmo animal submetido a rapida asfixia, que excita fortemente a plaquetose, que os megacariocitos no baço passam com facilidade da situação de extravascular á intravascular, passando através das aberturas que normalmente existem nas paredes conjuntivas das veias trabeculares.

Afirma Cesaris-Demel que as plaquetas existem sempre na circulação; que não devem ser consideradas como elementos independentes, capazes de multiplicar-se; que derivam pelo contrario diretamente do plasma sanguineo por processo de precipitação especificamente determinado por certos elementos normalmente contidos nos orgãos hematopoeticos (premegacariocitos). Estes, sob a influencia fisiologica da necessidade de plaquetas e muito mais quando este estimulo aumenta por causa de condições especiais experimentais ou espontaneas, provocam no plasma sanguineo, com o que estão intimamente em contato, a precipitação de uma substancia. Aderindo esta ao elemento mesmo, produz aumento consideravel de sua massa protoplasmatica e portanto de seu volume, fazendo-o adquirir assim os caractéres do megacariocito maduro. Esta massa de precipitação, pela atração das correntes sanguineas deforma-se, estira-se, fragmenta-se em pequenos pedaços, que em condições normais têm quasi a mesma forma e a mesma dimensão (plaquetas). Em condições patologicas podem ser de forma e volumes diferentes.

Ferrata e Negreiros-Rinaldi (1915) publicaram algumas pesquisas sistematicas sobre a genese, sobre a estrutura dos megacariocitos no embrião e no adulto e suas relações com as plaquetas. Estudada a genese do megacariocito no embrião e no adulto distinguiram tres tipos, sob o nome de megacarioblasto, megacariocito linfoide, megacariocito com granulações azulofilas. Os megacarioblastos representam a

primeira fase de diferenciamento da celula primordial: Em outros termos são celulas das quais se originam exclusivamente os megacariocitos. Os megacariocitos linfoides são celulas volumosas com protoplasma basofilo sem traços de granulações. Os megacariocitos granulosos apresentam em maior ou menor quantidade granulos tipicos azulofilos e um fundo plasmatico escassamente basofilo ou completamente oxifilo. Os megacariocitos com granulos azulofilos são considerados por Ferrata e Negreiros-Rinaldi como verdadeiros e proprios plaquetoblastos porque desses se originam as plaquetas.

No embrião, esses observadores, não encontraram plaquetas no periodo preepatico. Está isto em harmonia com a doutrina de Wright, se bem que os megacariocitos existam ainda no mesoblasto embrional porque neste periodo estão todos na fase megacarioblastica ou de megacariocito linfoide, sem traços de granulações azulofilos. Compreende-se, pois, que não podem ser nesta fase embriologica, capazes de gerar as plaquetas.

No figado embrional (compreendido o homem) encontram-se numerosas plaquetas analogas ás do adulto.

Ferrata e Negreiros-Rinaldi acrescentam que no figado como na medula ossea embrionaria existem celulas linfoides, verdadeiros monocitos, providos de nucleo de grandes dimensões e de protoplasma amplo, com numero mais ou menos consideravel de granulações azulófilas. Nesses elementos que procedem da celula conjuntiva primitiva, os grãos azues reunem-se algumas vezes no meio do protoplasma, em massa granulosa (cromomero) cercados de uma zona hialina (hialomero) identicos ás observadas no citoplasma dos megacariocitos. Daí a conclusão de Ferrata

e Negreiros-Rinaldi (1915) que esta celula monocitoide embrionaria fôsse sucetivel, como o megacariocito segundo os mesmos processos histologicos — de dar nacimento ás plaquetas.

Para Firket, estas celulas monociticas mostram, em realidade, imagens da destruição de plaquetas.

Confrontando a figura das pretensas celulas monocitoides, presentes no figado embrional, é facil persuadir-se, baseado nos maiores conhecimentos atuais, sobre os produtos de diferenciamento das plaquetas dos megacariocitos que se trata de megacariocitos granulosos em via de destruição progressiva com ponticulos de degeneração e de picnose nuclear.

Depois das fundamentais pesquisas recordadas, a literatura destes ultimos dez anos compreende massa imponente de publicações sobre plaquetas e suas relações com os megacariocitos.

Basta dizer que na maioria os experimentadores e os anatomo-patologistas, após o estudo do comportamento das plaquetas e dos megacariocitos nas varias hemopatias, inclinam-se a admitir a genese megacariocitica das plaquetas.

Por exemplo, Aschoff, recentemente (1925) em estudo sobre trombóses, afirma que, dada a uniformidade de consenso dos hematologistas mais autorizados, é injustificada a duvida sobre a origem megacariocitica das plaquetas.

Para comprovação do asserto basta lembrar os hematologistas que já antes de 1918 se ocuparam do argumento, tais como Frank, Kaznelson, Selliger, Stahl, Gaspar, Lambin, Sabin, Valterra, Bianchini. Crawfort, Glazmann, Bitonces, Benson e Johnston, Di Guglielmo, Klecki e Pelczar, Weger, Introzzi, Lega, Fontana, Fabris, Massa e Marinoni, Vasaturo etc. Todos estes admitem como demonstrada a doutrina de Wright.

Sabrazes, estudando a medula ossea de um justiçado, demonstrou que os pseudopodios dos megacaciocitos têm a mesma afinidade para a toluidina como o cromomero das plaquetas.

É, entretanto, contrario, Fotti. Conforme este, as plaquetas derivariam dos globulos vermelhos, pelo mecanismo sustentado por Vassale, Winogradow. Para este as plaquetas derivariam do corpo interno nucleóide. Mas sobretudo adverso da doutrina de Wright é Pianese que nega a preexistencia das plaquetas no sangue circulante. Perroncito considera as plaquetas como celulas independentes e capazes de reprodução. Svend Petri em numerosos trabalhos, procura demonstrar serem as próvas dos sustentadores da doutrina de Wright, a consequencia de erradas interpretações morfologicas. Á critica severa de Petri, responde brilhantemente Cesaris-Demel em recentissima revista sintetica (1930).

Recentemente Spaldoni sustenta que, no sangue da veia lienal, em seguida á contração do baço, se desenvolve constantemente intenso processo de desintegração celular a cargo das celulas endotelias. O nucleo destes desintegra-se em muitissimos granulos espessos. Si o elemento fôr integro agrupam-se em pequenas borlas que se acumulam no protoplasma circundante.

Si o nucleo foi isolado, esses granulos disseminam-se nos liquidos plasmaticos intercelulares.

Nos preparados fixados, o finissimo detrito granular têm os característicos morfologicos e tintoriais das granulações azulófilas: agrupados em pequenas massas, essas formariam o material de constituição do cromomero plaquetico. Da desintegração protoplasmatica tirava origem o hialomero plaquetico.

Com toda a probalidade fenomeno analogo veri-

fica-se tambem nos megacariocitos.

Ferrata, em numerosas pesquisas morfologicas sobre o baço em animais adultos, e em seguida á punção do baço no homem não mais poude documentar, nem em linha aproximativa, função plaquetogenetica aos monócitos e dos hemoistioblastos.

Não raro existem plaquetas nos monocitos dobaço, mas se trata sempre de processo evidente de fagocitóse e não de diferenciação plasmatica comparavel á do megacariocito em função plaquetoblastica em que o nucleo-pelo consenso unanime não participa inteiramente da formação do cromomero da plaqueta. Pelo contrario, ultimada a genese plaquetica dos megacariocitos, o nucleo é sempre reconhecivel fragmentado sob a forma de massa cromatica em picnose.

Pesquisas antigas e recentes, morfologicas e microquimicas, excluem a natureza cromatica do cromometro da plaqueta.

# CONCLUSÕES GERAIS SOBRE A GENESE E SOBRE A SIGNIFICAÇÃO MORFOLOGICA DAS PLAQUETAS

As plaquetas do sangue dos mamiferos originamse dos megacariocitos, após o processo de diferenciacão do protoplasma linfoide da celula gigante.

Os megacariocitos linfoides carregam-se de granulos azulofilos, emquanto diminue a basofilia de seu protoplasma. Os granulos, primeiramente colocados na zona perinuclear, difundem-se depois em todo oprotoplasma deixando camada larga livre de granulos, na periferia celular. No megacariocito granuloso, de aspeto ameboidecom pseudopodios longos, proeminentes, os granulos azulófilos agrupam-se analogamente aos do cromomero plaquetico no sangue circulante.

Em muitas celulas gigantes, seja no baço como na medula ossea, seja nos orgãos hematopoéticos do embrião, toda parte plasmatica fica constituida de

massa plaquetiforme.

As relações dos vasos venosos, com os megacaciocitos estão agora seguramente demonstradas. Mesmo os pseudopodios plaquetico dos megacariocito aparecem na luz vasal. Não raro é o megacariocito inteiro que passa com suas massas semelhantes a plaquetas no sangue circulante.

A pouco e pouco a massa hematoblastica tornase livre. Isola-se uma da outra, passando a constituir as plaquetas tipicas da circulação sanguinea.

As massas plaqueticas do sangue circulante não são todas devidas, como se acreditou até agora, conglomerado de plaquetas, mas com toda probabilidade representam elementos megacariocitos ainda em função plaquetocinetica.



### CAPITULO IV

## FISIOLOGIA

Sobre a significação funcional das plaquetas são admitidas muitas hipoteses. Cumpre reconhecer que mesmo atualmente são escassos os nossos conhecimentos a proposito, não obstante as numerosas pesquisas sobre as funções desses elementos. Nesses ultimos anos, embora, fixaram-se alguns pontos fundamentais de não pouca utilidade para a patologia e a clinica.

Basta lembrar que algumas sindromes clinicas, não raras aliás, muito graves, são atribuidas ás plaquetas e ás suas celulas formadoras (sistema megacariocitico).

Tomaram essas sindromes o nome de trombopenia, subdivisiveis em tipos diferentes. Nelas o fator plaqueta tem parte preponderante no determinismo da sindrome.

Basta pensar ainda no comportamento das plaquetas no choque anafilatico e anafilatoide. A trombopenia ou diminuição das plaquetas seguida ao choque, não reconhece como causa principal, a destruição em massa das plaquetas sanguineas, mas sim a sedimentação destas nos capilares viscerais.

Releve-se a importancia das plaquetas no fenomeno da coagulação do sangue, na retração do coagulo e nos processos de hemostasia espontanea. Realce-se a participação das plaquetas nos fenomenos de defesa contra a infecção. Ressalte-se a função antixenica, etc., e ter-se-á palida idéa da importancia das funções desses elementos no sangue circulante.

Plaquetas e coagulação do sangue — Numerosas e velhas pesquisas de Bizzozero, Hayem, Ducceschi, outras mais recentes de Achard, Morawitz, Le Sour e Pagniez, Sacerdotti e as recentissimas de Roskam, Tait e Bürcke, Bianchini, Gandolfo e de muitos outros, conduzem á conclusão de que as plaquetas participam na coagulação do sangue, mas não parecem absolutamente indispensavel ao fenomeno em si.

Aynaud, entre outros, é decididamente contrario á participação das plaquetas no fenomeno da coagulação. Baseia-se sobretudo em algumas observações experimentais e clinicas: Si com injeções de algumas substancias coloides tornarmos o sangue privado de plaquetas, constatamos que em muitos casos ele se coagula com a mesma facilidade do sangue normal.

Recentemente Roskam, baseado em pesquisas experimentais e observações clinicas, sustenta que a presença das plaquetas no sangue ou de substancias desses derivados, não parece indispensavel para coagular-se o plasma.

Na doença de Werlhof, faltam ou são muito escassas as plaquetas no sangue circulante e, apesar disso, o sangue conserva o seu poder coagulante.

De qualquer modo, é de observação comum, que quanto mais numerosas as plaquetas, maior é o poder coagulante do sangue, estando presentes no plasma as outras substancias necessarias á coagulação.

Basta lembrar que na hemofilia o numero de plaquetas é normal. Contudo a coagulação do sangue sucede com grande dificuldade e é enormemente retardada. O fenomeno da coagulação que em ultima analise, consiste essencialmente na transformação do fibrinogenio preexistente no plasma em fibrina, é, como surde, desta leve demonstração, um fenomeno assaz complexo, no qual participam tambem as plaquetas em união com outras substancias do plasma.

É certo que em condições habituais as plaquetas do sangue extraidas dos vasos apresentam no momento em que aparece o reticulo de fibrina, acentuada modificação morfologica. Tomariam forma ora globulosa, ora curta e achatada, ora fina.

Em 1926 Tait e Bürcke, teriam observado com o ultra-microscopio em preparações fixadas que, antes da coagulação do plasma, as plaquetas sofrem certo aumento de volume com formação, na periferia, de pequenas vesiculas claras que, desintegrando-se da plaqueta, se libertam no plasma, movendo-se com diminuição de volume. Seria ao longo de seu trajeto que apareceriam os primeiros filamentos de fibrina.

Assim é de se notar que as plaquetas se unem na superficie de um fio introduzido no sangue, imediatamente antes que se depositem as primeiras massas de fibrina.

Finalmente, é de conhecimento comum, que os fatores que impedem ou retardam a coagulação do sangue (paredes vasculares vivas e sãs, superficies parafinadas, baixa temperatura, oxalatos e citratos alcalinos, antitrombina, clorhidrato de cocaina, os arsenobenzois, a asfixia aguda, a heparina são os que conservam as plaquetas, opondo-se-lhe á aglutinação. Esta correlação entre a conservação das plaquetas e a falta de coagulação, a coincidencia do comparecimento dos primeiros filamentos de fibrina e as alterações morfologicas das plaquetas são consideradas

como demonstrativas pela participação das plaquetas no fenomeno da coagulação. A maioria dos autores concluem que as alterações apresentadas por estes elementos são a preparação indispensavel da coagulação, nas quais esses representariam o "primum movens".

A participação da fibrina seria, para estes autores, precedida "de uma fase ativa, vital, devida á participação funcional de elementos especiais do sangue e que se manifesta a nós com o fenomeno da aglutinação". (Ducceschi 1915).

Nem todos os autores estão de acôrdo sob este ponto, e muitas objeções foram feitas a esta hipotese. A primeira entre elas, é a que considera a participação das plaquetas no fenomeno da coagulação como especie de epifenomeno, sem ser o "primum movens".

Concluindo, deviamos ter como provavel a existencia de alterações morfologicas profundas das plaquetas no momento em que sucede a precipitação da fibrina, e reter pois ignorados tambem as relações de casualidade entre os dois fenomenos.

Admitindo, pois, que as plaquetas participam do fenomeno da coagulação, resta vêr, como e com que mecanismo e por meio de quais substancias sucede esta participação.

Segundo Bordet, a coagulação do sangue consiste em processo particular de insolubilização do fibrinogenio que se efetua sob a influencia de uma substancia termolabil: a trombina. Esta substancia resultaria da união em presença de ionte calcio, de dois geradores, dos quais uma, o serozima, existe no plasma sob a forma de pro-serozima, a outra o citozima, libertada pelas celulas brancas do sangue.

As plaquetas no curso do processo da coagulação,

poriam em liberdade um principio que resiste á temperatura de ebulição, é termoestavel, soluvel no alcool, eter, cloroformio, essencia de petroleo, toluol; pouquissimo soluvel na acetona.

Este principio que se comporta como um lipoide, foi denominado por Bordet e Delange com o nome de citozima.

Concluindo, parece acertado que a intervenção das plaquetas na coagulação seja devido, pelo menos em parte, a substancias lipoides, nelas contidas e que se libertam no momento de sua lise.

Plaquetas e retração do coagulo — As plaquetas têm notavel importancia ainda no fenomeno da retração do coagulo fibrinoso.

A retração do coagulo, fenomeno nitidamente diferente do da coagulação do sangue, produz-se cerca de vinte minutos depois da coagulação a temperatura de 37° e, por efeito dessa retração, o sôro separa-se dos outros componentes do sangue.

É opinião de numerosos autores que a retração do coagulo depende essencialmente da presença no sangue e, no coagulo mesmo, de plaquetas em numero suficiente, pouco ou nada alteradas. Observações clinicas e pesquisas hematologicas e experimentais numerosas, sustentam essa hipotese que atribue ás plaqueta do sangue um poder retratil verdadeiramente especifico.

O primeiro a pôr em evidencia esta propriedade foi Hayem, em fins de 1882, demonstrando com Barrier que o plasma, privado das plaquetas mediante centrifugação, dá um coagulo irretratil e que ao coagulos dos liquidos desprovidos de plaquetas (linfa, serosidade patologica) não apresentam o fenomeno da retração.

Demais, Hayem, foi o primeiro a chamar a aten-

ção sobre a coincidencia constante da trombopenia acentuada e de escassa retratilidade do coagulo no decurso de alguns estados patologicos (purpura hemorragica, anemia perniciosa progressiva, alguns estados caqueticos avançados).

As afirmações de Hayem acharam confirmação em numerosas pesquisas sucessivas de Le Sourde e Pagniez, Arthur e Chapiro, Ducceschi, de Vinci e Chistoni, Glauzmann, Bordet e Delange, Lee e Vincent e tantos outros.

Le Sourde e Pagniez reproduziram experimentalmente a irretratilidade do coagulo, com auxilio do sôro anti-plaqueta. Preparam esse sôro, segundo o modo habitual de produção das cito-toxinas, injetando no peritoneo de um cobaio, emulsões de plaquetas isoladas do sangue de coelho; praticam de 3 a 5 injeções com 8 dias de intervalos e sangram o animal 8 a 10 dias depois da ultima injeção.

O sôro, assim obtido, ensaiado "in vitro", sobre as plaquetas de coelhos destroi-as e submetendo-as durante pouco tempo á fracas doses de sôro, podemos, "in vitro", fazer perder as plaquetas suas propriedades retraidoras, assim como podemos verificar, transpondo-as em seguida no plasma oxalatado recalcificado.

"In vitro", o sôro anti-plaquetico suprime a retratilidade do coagulo, e a irretratilidade é proporcional a quantidade de sôro empregado; pelo contrario, a adição de sôro normal aumenta mais depressa a retratilidade.

"In vivo", a injeção, no coelho, de dóses fracas desse sôro anti-plaquetico torna o coagulo irretratil, parcial ou totalmente segundo as dóses. Ao mesmo tempo, constatamos o desaparecimento ou a diminuição extremamente consideravel dos hematoblastos do sangue circulante. Podemos reencontrar esses caractéres em sangrias feitas até 24 a 36 horas depois da injeção. Ora, a injeção comparativa no coelho, de sôro de cobaio normal não dá nem irretratilidade permanente e não acarreta senão modificações numericas transitorias das plaquetas.

Irretratilidade equivale pois á falta ou a modificação profunda das plaquetas. E, esse fato bem estabelecido por George Hayem, encontra-se assim demonstrado, experimentalmente de novo pelas pesquisas de Sourd e Pagniez.

M. Arthur e Mlle. Chapiro (1908) admitem paralelismo entre a retratilidade do coagulo e a integridade das plaquetas, que, para eles, intervem no fenomeno como elementos vivos. É assim o fluoreto de sodio, a agua distilada, o frio, que são nocivos ás plaquetas, entravam a retração, ao passo que o citrato e o oxalato de sodio, conservadores dos elementos, permitem a retração. Emfim, notaram que a retração do coagulo não se fez em vasos parafinados, como si as plaquetas, ou os produtos que deles derivam tivessem necessidade para manifestar sua atividade, da excitação devida ao contato de uma parede estranha. Mas em vasos parafinados, podemos provocar a retração pela adição de uma maceração de órgãos, como se os elementos desta maceração exercessem sobre as plaquetas uma excitação quimica, suprindo a falta da excitação mecanica.

Baseado nas pesquisas desses autores, está demonstrado que a retração do coagulo é rigorosamente proporcional á quantidade de plaquetas acrecida ao plasma antes da sua recalcificação.

Esta propriedade de retração das plaquetas é termolabil. Diminue já a temperatura que vaí de 40° a 50°. A 0° tal ação é inibida. A 15° destrói-se.

Não se conseguiu até agora isolar das plaquetas um principio dotado de propriedades retrateis, apesar de alguns autores falarem de um fermento de origem plaquetica denominada retractozima ou retractina (Glanzman, Kaznelson).

O calcio parece indispensavel para que suceda a retração do coagulo.

Nota-se, pois, que se pode observar tambem a irretratilidade do coagulo no curso de algumas afecções não acompanhadas de trombopenia, p. ex. na pnemonia. Este fato não foi ainda esclarecido em sua genese. Póde-se ter como hipotese, existam perturbações das plaquetas ou existam substancias quimicas que possam exercer modificações sobre a qualidade do fibrinogenio ou da fibrina.

Por outra parte, existem casos de trombopenia nos quais a retração é normal em individuos fortemente trombopenicos (18.500 a 28.600 plaquetas p. mm³). Tambem Fonio (1923) verificou um caso de retração normal em um anemico com 13.500 plaquetas e 2.200.000 globulos vermelhos p. mm³.

Para explicar este excepcional comportamento do coagulo em tais condições pode-se pensar em uma hiperatividade das plaquetas existentes no sangue.

Tambem Sacerdotti experimentalmente observou que o sangue de cães tornado quasi desprovidos de plaquetas, com injeções de sôro anti-plaquetico, dá um coagulo, o qual sofre uma retração como o de um sangue normal. Recentemente Roskam (1926), em pesquisas experimentais poude observar a retração do coagulo fibrinoso com ausencia absoluta de plaquetas.

O fenomeno da irretratilidade do coagulo têm sido ligado a um disturbio da concentração ionica.

Sicard fez retrair um sangue de purpura irre-

tratil acrescentando calcio e tambem Roskam demonstrou que, por falta ou por excesso de calcio, vem a faltar a retração do coagulo. Uma pura ação eletrolitica não póde explicar de modo suficiente o processo de retração. Basta aquecer as plaquetas (Le Sourd e Pagniez) para impedir a retração. Este fato não podia certamente ser influenciado por uma ação puramente eletrolitica.

Apesar de tudo, a importancia das plaquetas no processo de retração do coagulo não está averiguada, no estado atual de nossos conhecimentos. Pesquisas experimentais e, especialmente as observações clinicas, demonstram que a retração do coagulo não está sempre estreitamente ligada á presença das plaquetas no sangue.

Portanto, se póde ainda reter que a retração do coagulo dependa antes de uma propriedade particular da fibrina, reconhecendo todavia que o acrecimo de plaquetas pouco ou nada alteradas, aos liquidos coagulaveis do organismo, aumente consideravelmente a retratilidade do coagulo.

Plaquetas e hemostase expontanea — O estudo histologico do processo de obliteração das feridas vasculares demonstrou que as plaquetas têm neste fenomeno uma parte muito importante.

Já antigamente foi observado que em uma pequena ferida de um vaso se formava um pequeno coagulo branco, dito coagulo linfatico ou trombo branco o qual determinava a hemostase espontanea.

Sucessivas pesquisas de Hayem, Bizzozero, Lubnitzky Eberth e Schimmelbusch, Loeb, Ribert, Meneghetti e outros, demonstraram que o trombo branco é formado sobretudo de plaquetas aglutinadas, com raros globulos vermelhos e leucocitos englobados.

A formação do trombo branco verificar-se-ia com

estas sucessões de fenomenos. Quando um vaso é lesado ou com uma puntura ou por causa de um talho ou cauterização quimica ou termica, a corrente sanguinea modera-se na vizinhança da superficie endotelial alterada. A disposição dos elementos circulantes nos vasos vêm portanto sofrer profunda modificação.

Na corrente sanguinea nota-se que os elementos morfologicos ocupam a zona central, emquanto o plasma que se encontra imediatamente proximo ao endotelio, não contêm sinão alguns leucocitos. Afrouxada a corrente, as plaquetas cuja força viva é minima, abandonam o eixo do vaso, penetram no estrato periferico ou se fixam no endotelio lesado, aglutinandose entre si.

Forma-se desse modo massa de plaquetas sempre mais volumosas e sempre mais compacta. Participam de sua formação, em pequena parte, os globulos brancos e ainda menos os globulos vermelhos. De tal modo, a ferida vascular vem a se obliterar.

Frank dá grande importancia á intervenção das plaquetas no fenomeno de hemostase espontanea. Este autor retem, que tambem em condições fisiologicas, o jogo da inervação vasomotora, os produtos do escambo intermedio e especialmente os continuos microtraumatismos (esfregamento das roupas, deslocamento da pele nos movimentos) pódem representar causas suficientes pela formação de hemorragias. O fáto é, pois, impedido pela presença das plaquetas do sangue circulante, as quais colocando-se na periferia da corrente circulatoria teriam a função de tapar os estomas do endotelio dos capilares. Se vêm a faltar essa ação mecanica das plaquetas, como nas trombopenias, os estomas do endotelio não se tapam,

formando-se facilmente os extravasamentos sanguineos.

Alguns autores (Hanau, Weigert, Sahli) retêm que a formação do trombo branco acompanha sempre e necessariamente o processo de coagulação sanguinea, participando a fibrina na formação do trombo. Segundo outros (Eberth, Schimmelbusch, Loeb), o coagulo seria o resultado só da aglutinação das plaquetas sem que suceda a coagulação plasmatica. Para estes, o deposito da fibrina não é indispensavel e seria um fato episodico acessorio e secundario.

A hipotese de que as plaquetas teriam importancia nos fenomenos da hemostase espontanea, seria sustentada tambem pela argumentação clinica. Sabe-se que o sangue na purpura hemorragica coagula entre um periodo de tempo normal. Mas nesta sindrome, o tempo de hemorragia é sempre muito prolongado, isso porque reduzidos ou faltando as plaquetas, não se formariam os trombos plaquetais destinados ao fechamento das pequenas lesões capilares.

Tambem as pesquisas experimentais de Duke, Ledingham, e Radson, Muner e Krumbhaar, Lee e Robertson, Wataliki, Bedson, Zunz e Govaertz e recentemente Bedson e Johnston, em animais tratados com diversas substancias toxicas (toxina difterica, tuberculina, benzol, sôro anti-plaquetal), confirmaram a função das plaquetas no processo de hemostase. Demonstram que a trombopenia é causa direta imediata, e suficiente do prolongamento do tempo de hemorragia.

Alguns autores, e, entre estes, principalmente-Roskam, não admitem sem reserva esta pretensa ação indispensavel e necessaria das plaquetas no processo de hemostase. Alegam que na ausencia das plaquetas, a coagulabilidade plasmatica, póde muito bem permitir eventualmente a hemostase rapida da ferida dos capilares, das arteriolas e das pequenas veias.

Segundo Roskam, a hemostase espontanea dependeria de dois fatores: a aglutinação das plaquetas no ponto da lesão endotelial e precipitação de um reticulo da fibrina. A deficiencia de um só destes fatores não seria suficiente para prolongar de modonotavel o tempo de hemorragia. Se pelo contrario, os dois fatores são suficientemente comprometidos, o tempo de estilicidio seria prolongado.

Além disso, Roskam faz notar que em patologia humana se observam frequentemente casos com acentuada trombopenia, sem que o tempo de coagulação seja modificado de modo notavel, e caso nos quais existe notavel prolongamento do tempo de estilicidio, sem que corresponda a uma diminuição consideravel do numero de plaquetas e da coagulabilidade do sangue.

Por isso, para Roskam, a causa da hemorragia nos estados de purpura não seria geral, hematica, mas local, ou seja vascular. Consistiria em alteração do endotelio vasal. Este, em confronto com o endotelio são, seria menos opsonizavel pelas proteinas plasmaticas e menos tromboplastico, porque o seu poder coagulante sobre as proteinas plasmaticas está diminuido.

Roskam é de parecer que alguns fatores que possam concorrer no processo de hemostase espontanea, e aos quais não poucos autores (Frank) dão grande importancia, teriam pelo contrario parte secundaria. Tais fatores seriam: A contração dos vasos lesados, por irritação direta (Magnus); a modificação que sofre a circulação no vaso interessado e nos vasos vizinhos (auto-regulação de Schultz, desvio da correntecirculatoria, segundo Stejemann) e os fenomenos vasomotores de origem nervosa ou dependentes de substancias libertadas das celulas dos tecidos lacerados e dos elementos figurados do sangue.

Portanto, Roskam conclue que, no estado atual de nossos conhecimentos, as plaquetas não têm parte nem essencial nem preponderante na hemostase das feridas dos capilares, das arteriolas ou das pequenas veias.

Kaznelson, ainda recentemente insiste no atribuir á trombopenia valor essencial pelo aumento da duração da hemorragia.

Aglutinação das plaquetas — A aglutinação é uma das propriedades característica das plaquetas e é a esta propriedade que essas devem a sua participação em alguns fenomenos em que tomariam parte (formação do trombo, função antixenia etc.).

É interessante notar que a aglutinação das plaquetas não está necessariamente ligada á coagulação, mas pode produzir-se em numerosas circunstancias

independentemente.

O primeiro problema que se apresenta é o de vêr se esta aglutinabilidade, possuida em alto grau pelas plaquetas, está em relação com a vida desses elementos.

De algumas pesquisas de Achard e Aynaud e de Roskam poude-se estabelecer que a aglutinação das plaquetas entre si, é fenomeno puramente passivo, independente das vidas desses elementos.

Póde-se provocar aglutinação de plaquetas in vitro com numerosas substancias coloidais organicas (gelatina, ovoalbumina, peptona, goma-arabica, mastiche, sôro etc.) e inorganicas (mercurio, prata, platina, ferrocianeto de ferro etc.) e extratos de tecidos.

A injeção intra-venosa de uma destas substan-

cias determina o desaparecimento das plaquetas da circulação, exercendo sua ação mediante o mecanismo da aglutinação, que tem por efeito reunir as plaquetas na rede vasal visceral.

O mecanismo intimo da aglutinação das plaquetas não está perfeitamente nitida. Sabe-se tão sómente que é fenomeno puramente passivo, independente da vida mesmo das plaquetas. Parece demais, que as plaquetas não aderem entre si. Põem-se em contato com a superficie nua mediante a intervenção de um estrato subtilissimo de proteina plasmatica "atmosfera plasmatica" dos francêses (Roskam), a que aderem as plaquetas intimamente.

A aglutinação das plaquetas é, pois, fenomeno de natureza essencialmente humoral.

Plaquetas e função antixenica — É de conhecimento antigo que as plaquetas suspensas no plasma original aderem geralmente e de modo quasi imediato á superficie dos corpos estranhos com os quaes estão em contato. Si se entroduz na torrente circulatoria um pedaço de fio ou um vidro observa-se que após alguns minutos a superficie do fio ou do vidro está toda recoberta de plaquetas. Esta atividade das plaquetas dita tambem "emplaquetamento" acontece tambem com os microbios que por ventura se encontram na circulação, onde esta função denominada "antixenica", conquistou notavel importancia nos fenomenos imunitarios.

Numerosas são as pesquisas sobre este argumento, desde as mais antigos de Hayem e Bizzozero, Eberth, Sahli, Levaditi, Aynaud e as mais recentes de Bull, Rieckenburg, Delrez e Govaerts, Le Fevre, Roskam, Krischwsky, Tscherikower e outros.

Delrez e Govaerts verificaram muito bem o fenomeno: Se os germes introduzidos na circulação são incapazes de determinar um estado septicemico no animal de experiencia, esses germes desaparecem quasi que instantaneamente da circulação. Estes germes, comportam-se como centros da aglutinação das plaquetas e rapidamente encontram-se englobados por massas plaqueticas. Estas massas desaparecem rapidamente da circulação periferica, emquanto ao mesmo tempo advem uma passageira trombopenia e leucopenia.

As massas de germes e plaquetas encontram-se nos capilares do figado, pulmão, baço e em menor quantidade nos rins.

Este emplaquetamento representaria um valor importantissimo, essencial dos processos de defesa que caracterisam a imunidade natural e tambem na imunidade adquirida.

É interessante notar que nem todos os germesse comportam do mesmo modo. Alguns apresentam o fenomeno do emplaquetamento.

Outros, pelo contrario, em contato com as plaquetas, são absolutamente refratarios a este genero de aglutinação.

Delrez e Govaerts chamaram a atenção sobre o fato de que a aderencia dos microbios ás plaquetas e a sua fagocitose, são sempre estreitamente paralelos. Frisa que estes fenomenos do emplaquetamento e da fagocitose estariam na dependencia da modificação (que Roskam propõe chamar opsonização) realizada na superficie microbiana, decorrente do contacto como o plasma ou o sôro.

Existe, portanto, um fator ligado ao plasma ou ao sôro, que age sobre os germes provocando-lhe a opsonização da superficie, o que dá causa do emplaquetamento.

Depois que as massas de plaquetas assim for-

madas ficam retidas em alguma area (figado, baço, pulmão e rim), os germes e em geral os corpos estranhos, são fagocitados pelos leucocitos.

Nada se sabe de preciso sobre o destino das plaquetas que estão depositadas sobre os germes ou sobre outros corpos estranhos. Não se sabe se favorecem com sua presença a ação fagocitaria dos leucocitos.

Pesquisas recentes a proposito, de Roskam (1924), não evidenciaram nas plaquetas a presença de fermentos proteolíticos ou lipolíticos. Das pesquisas de C. Popescu (1926 parece que o emplaquetamento determina nos aspetos dos germes, atenuação da virulencia.

De qualquer modo que seja, o fenomeno do emplaquetamento é considerado portanto como fator de eliminação de corpos estranhos introduzidos na corrente circulatoria. Nos casos em que este fenomeno de emplaquetamento não póde verificar-se por falta de plaquetas ou pela presença de algumas perturbações humorais (choque peptonico), a parcela opsonizada no sentido de Roskam desaparece do sangue circulante pela intervenção de outros mecanismos. O primeiro dentre esses é a aglutinação verdadeira (pelos germes) sem a intervenção das plaquetas. O segundo, a ação fagocitaria dos elementos do reticulo-endotelio, ou seja a "retenção endotelial" de Dal-court-Bernard.

Segundo Roskam, o fenomeno do emplaquetamento é devido á opsonização, fenomeno este que seria de capital importancia e da qual depende a adesão das parcelas estranhas, seja ás plaquetas, seja aos fagocitos, e verdadeiramente a todos os elementos do sistema reticulo-endotelial.

Mais profundamente estudado o fenomeno do

emplaquetamento, observou-se que a adesão, a aderencia das plaquetas á superficie das parcelas estranhas opsonizadas, é, como a aglutinação das plaquetas entre si, um fenomeno puramente passivo, independente da vida destes elementos. A aderencia dos microbios ás plaquetas, não é, segundo Govaerts (1923), o resultado de atração entre corpos de carga eletrica de sinal contrario. Mas se dá pelo contrario por efeito de "força coesiva". Em que consiste essa força coesiva?

Baseado em experiencias feitas com esse escopo, e em concepções fisico-quimicas atuais, ficou patenteado (Roskam) que a aderencia das plaquetas no fenomeno do emplaquetamento não aparece simplesmente por meio do contato direto da superficie núa das plaquetas com a superficie do corpo estranho modificado do plasma ou do sôro, mas o contato acontecerá entre a superficie do corpo e um estrato subtilissimo, uma especie de pelicula de proteina plasmatica absorvida pelas plaquetas.

Para Roskam essa pelicula, que ele chama de "atmosfera plasmatica" seria em ultima analise, o agente da aderencia das plaquetas na superficie opsonizada. Roskam, baseado nos conhecimentos atuais sobre a imunidade, releva que o fenomeno da opsonização seria o resultado da absorção por parte dos corpos opsonizaveis, de alguns coloides do plasma ou do sôro.

As pesquisas de Gengou (1908) mostraram a adesão de certos coloides ás particulas minerais em suspensão na agua ou em solução isotonica. Estas mantem a disseminação, a dispersão destas particulas. Roskam pensa que a atmosfera coloidal que se forma em torno das plaquetas, mantem a suspensão no plasma.

Quando a atmosfera de uma plaqueta entra em relação com uma superficie opsonizada, o equilibrio coloidal desta atmosfera se rompe. Dá-se uma certa floculação destes coloides que circundam a plaqueta, diminuindo-lhe o poder de dispersão e dando-se assim a aderencia da plaqueta á superficie opsonizada. Tal aderencia torna-se ainda mais intima por efeito da floculação. A maior parte da atmosfera coloidal participa desta floculação, compreendendo-se agora como plaquetas fixadas ás particulas estranhas, possam por sua vez fixar outras plaquetas.

Plaquetas e imunidade humoral — Independentemente do fenomeno de aglutinação das plaquetas, quis-se investigar eventual ação das plaquetas nos processos de defesa do organismo e nos da imunidade.

Hayem e tantos outros notaram modificações, presupostas constantes, do numero das plaquetas nas doenças infecciosas agudas. Hayem define a plaquetose que se verifica em determinados momentos do decurso de uma infecção septicemica, com a denominação de "crise hematoblastica".

No estado atual de nossos conhecimentos, devemos reconhecer que a participação das plaquetas nos processos da imunidade não está ainda demonstrada de modo seguro.

Não está tambem demonstrada a intervenção das plaquetas na elaboração dos fatores habituais da imunidade humoral, como a alexina, a sensibilizadora, a aglutinina, a preciptina, etc.

Gruber e Futaki observaram que as plaquetas no momento da coagulação do sangue, derramariam no sôro um principio bactericida para o carbunculo. Abderhalden e Deejetien encontraram nas plaquetas de cavalos uma diastase que divide os polipéptides.

Barreau pelo contrario, não conseguiu eviden-

ciar nenhum fermento peptico, triptico, lipolitico, amilolitico ou autolitico, nas plaquetas do cavalo, boi e coelho.

Os mesmos resultados negativos obteve Roskam, no cão e no coelho, com relação aos fermentos proteolíticos e lipolíticos.

As plaquetas no choque anafilatico — Injeções endovenosas, em dóses suficientes, de peptoma, ovalbumina, saponina, glicogenio, goma arabica, pancreatina, gelatina, leite, sôro heterogeneo, sôro homogeneo tratado com agar, estratos de tecidos, sulfureto de arsenico, mercurio, prata, ouro coloidal etc., determinam no animal, fenomenos gerais graves, acompanhados de nitida diminuição do numero dos leucocitos, principalmente polinucleares e das plaquetas do sangue circulante. A trombopenia e os fenomenos gerais seriam mais nitidos, se o organismo estivesse sensibilizado pelas mesmas substancias injetaveis. Tais substancias que "in vivo" provocam trombopenia, "in vitro" aglutinam as plaquetas.

Que acontece ás plaquetas durante o choque anafilatico e anafilatoide?

Pesci, Freund, Dresel e Freund, acham que no decurso do choque, deve suceder uma certa destruição de plaquetas. Achard e Aynaud, Roskam, Cesaris-Demel e outros, crêm que se trata de simples modificação do deslocamento das plaquetas que, aglutinando-se, se amontoariam nos capilares das visceras profundas. Segundo Roskam, neste processo de sedimentação das plaquetas, interviriam também as celulas endoteliais dos vasos, as quais também modificadas como as plaquetas, pelas substancias injetadas, entreteriam os montões plaquetinicos produzidos.

Behring e Pesci dão grande importancia na explicação dos fenomenos do choque anafilatico, á formação desses montões de plaquetas como causa de embolo nos capilares e nas pequenas arterias do cerebelo, da pia mater e do plexo coroide.

Pesquisas ulteriores de Zunz e Govaerts, Klecki e Pelczar, demonstraram que a aglutinação das plaquetas não constituí a condição essencial dos fenomenos gerais que caracterizam o choque anafilatico e anafitactoide.

Plaquetas e circulação do sangue — Alguns autores, entre os quais, Le Sourd e Pagniez e Roskam, demonstraram que as plaquetas teriam uma certa importancia na genese dos fenomenos vaso-motores, já concorrendo para a determinação da pressão arterial, já intervindo nos fenomenos de hemostase espontanea.

Le Sourd e Pagniez demonstraram em 1913, que o extrato aquoso de plaquetas de coelho, exerce em animal da mesma especie, ação hipotensiva. O principio ativo, soluvel no alcool, é termoestavel e resiste a 120° — C.

Roskam retomou as pesquisas de Le Sourd e Pagniez, e observou que extratos de plaquetas de coelho, têm ação hipotensiva notavel.

A queda da pressão observada nestas experiencias, parece que dependem de uma ação vaso-dilatadora exercida sobre os capilares (Roskam). Por outro lado observou-se que o extrato aquoso de plaquetas exercia sobre os grandes vasos isolados, nitida ação vaso-constritora.

Stewart e Zucker Feissly pensaram que, quando ao nivel de um vaso se forma primeiro o trombo branco constituido de plaquetas e em seguida o coagulo hematico, as plaquetas libertariam no meio ambiente um principio vaso constritor, o qual, reduzindo ativamente o calibre dos vasos sanguineos favoreceria a hemostase.

Roskam, para explicar esta aparente contradição entre a ação hipotensiva e a ação vaso constritora atribuida ás plaquetas, chegou a conclusão de que o extrato aquoso das plaquetas de coelho aumenta o tono das arterias e tambem das veias, emquanto que tem um poder vaso-dilatador sobre os capilares.

O extrato de plaquetas, teria para Roskam, uma ação vasomotora semelhante á exercida pela istamina, como observaram Dole e Richards.

No homem observa-se certo paralelismo entre o valor da pressão arterial minima e o numero das plaquetas. Estas seriam mais numerosas nas hipotensões, menos nas hipertensões (Le Sourd e Pagniez, Tomasinelli e Frondini).

Para Roskam não é a pressão arterial que influencia o numero das plaquetas, mas modificações da pressão e modificações das plaquetas seriam devidas ao mesmo fator.



## CAPITULO V

#### NUMERO

A determinação exata do numero de plaquetas no sangue circulante é muito dificil, devido a grande vulnerabilidade desses elementos ao serem retirados do meio em que vivem para o exterior. Isso reflete-se nos numerosos metodos com os quais tem sido objetivada a contagem de plaquetas. Não nos deve surpreender a diferença entre os algarismos medios de cada metodo. Ademais, o numero de plaquetas no estado de saude oscila dentro de largos limites.

Conhece-se a delicadeza de estrutura das plaquetas, a facilidade com que elas desaparecem da circulação sanguinea, a rapidez de seu reaparecimento em certas condições, a presteza com que se deformam e a maneira pela qual aderem ao endotelio vascular ofendido ou aos corpos extranhos introduzidos na circulação. Por todas essas razões, torna-se evidente ser curta a vida das plaquetas.

Trabalhos experimentais diversos e fatos clinicos demonstram, com efeito, que as plaquetas são produzidas e destruidas cada dia em quantidade muito elevada. Aliás, o numero total das plaquetas circulantes póde ser regenerado dentro de 3 a 5 dias (Duke). Não nos surpreende, pois, que o numero desses elementos no sangue possa variar tanto em intervalos tão curtos, mesmo no estado de saude.

Assim Caccuri, verificou diminuição sensivel após rigoroso exercicio fisico; Deckwitz notou que o numero de plaquetas aumenta quando a temperatura se eleva; Wittkower que, depois de um banho quente, as plaquetas elevam-se de 220.000 para 300.000.

Mackay afirma que o numero varia, não somente de individuo para individuo, de um dia para outro, e ainda no mesmo dia em horas diferentes. Em um paciente no qual foram feitas varias contagens no mesmo dia, o referido experimentador observou uma oscilação maxima de 200.000 plaquetas, sem causa aparente.

Mau grado essa variabilidade, o conhecimento do numero de plaquetas é, sem duvida, o problema que mais interessa á pratica clinica, pelo subsidio que tal pesquisa pode trazer á elucidação do diagnostico de algumas entidades morbidas.

Por plaquetose ou hiperglobulinemia entende-se o aumento das plaquetas no sangue circulante. A diminuição é designada por trombopenia, plaquetopenia ou hipoglobulinemia.

A plaquetose apresenta-se em numerosas hemopatias, tanto essenciais como sintomaticas. Encontra-se nas sindromas leucemicas granulociticas, no granuloma maligno, na malaria, na anemia post-hemorragica e em numerosas outras anemias secundarias. Na clorose notam-se algumas vezes numerosissimas plaquetas gigantes, como verificaram Naegeli, Pappenheim e Ferrata. Segundo Helber, aumentam tambem nas formas de anemias secundarias, particularmente na anemia do carcinoma. Nas formas infecciosas foram estudadas por numerosos autores. Hayem e seu aluno Raine, encontraram

diminuições das plaquetas no periodo agudo de muitas doenças infecciosas e aumento durante a convalecença.

Baseado em sua teoria, pensava Hayem, que durante o processo infectivo houvesse uma exagerada destruição de eritrocitos, recompensada em seguida pelo aumento do numero de hematoblastos na circulação (crise hematoblastica de Hayem).

Afanassiew chegou ás mesmas conclusões de Hayem, ao fazer o estudo de sangue na febre tifica, na pneumonia, na tuberculose pulmonar. Halla encontrou plaquetose nos processos infecciosos, bem como na convalescença dos mesmos sem entretanto ter feito contagens sistematicas. Fusari verificou um aumento das plaquetas no decurso das doenças não febris e na clorose. Nas doenças febris esse autor notou que as cifras das plaquetas tenderiam a baixar-se até a morte.

Pizzini achou plaquetopenia, isto é, uma diminuição das plaquetas, no curso das doenças infecciosas proporcional a elevação termica.

Emdem encontrou, como Hayem, um aumento das plaquetas, nas infecções agudas e no decurso de varios processos anemicos; uma diminuição, pelo contrario, nas anemias graves, como na perniciosa, bem como nas leucemias.

Dettermann, encontrou as plaquetas aumentadas nas infecções cronicas, especialmente no cancro. Tschistovitch fez um estudo sistematico das plaquetas em numerosas doenças infecciosas e concluiu afirmando que a cada invasão de substancias infectiva no organismo, este reagia, não somente com modificações a cargo dos leucocitos e tambem das plaquetas, as quais em linha geral, diminuiram na fase inicial do periodo de estadio e aumentaram na convalescença. Tschistovitsch põe em relação esses fatos, pensando que as plaquetas sejam portadoras de substancias defensivas. Corroborando essa hipotese, devemos recordar que já Gruber e Futaki, como vimos em pagina anteriores, teriam realmente demonstrado que as plaquetas continham substancias defensivas contra determinados microorganismos (para o carbunculo, por exemplo). Tambem Ottolenghi pensa que as plaquetas concorrem para a produção da alexina.

Aynaud fez numerosas pesquisas de contagem de plaquetas, em condições normais e patologicas. Segundo esse autor, as plaquetas em regra aumentariam na leucemia mieloide. Tambem nas anemias leves e na clorose as modificações são minimas. No decurso das infecções agudas as plaquetas apresentam variações que sempre são constante para a mesma doença; na roseola e escarlatina, as plaquetas são escassas no inicio da doença, aumentando progressivamente, acentuando-se quando a defervecencia é rapida. Em seguida, o numero de plaquetas volta ao normal. Aynaud encontrou plaquetose post-infectiva na pneumonia, na meningite cerebro-espinhal, na infecção puerperal e na angina.

Wright de acôrdo com sua teoria, como já foi dito, encontrou paralelismo entre o numero de megacariocitos e o das plaquetas. É certo que, como observa Cesaris-Demel, se for verdadeira a teoria de Wright, devemos proceder pari-passo o estudo da modificação dos megacariocitos e das plaquetas. Efetivamente as plaquetas aumentam na leucemia mieloide (granulocitica), onde tambem os megacariocitos nos orgãos hemopoeticos estão aumentados, si bem que diminuidos, por exemplo, na leucemia linfocitica, na anemia perniciosa, na trombopenia es-

sencial e atrofia mieloide progressiva, onde precisamente encontra-se escassos megacariocitos na medula ossea.

Di Gugliemo distinge a plaquetose simples da plaquetopenia, representada não só pelo aumento numerico das plaquetas no sangue circulante, mas ainda pela presença no sangue de celulas progenitoras das plaquetas, isto é, de megacariocitos granulosos em função plaquetocinetica.

Os dados sumarios que acabamos de expôr, revelam claramente o interesse pratico da numeração sistematica dos hematoblastos em diversos estados morbidos. Limitando nosso trabalho ao estudo da histofisiologia normal daqueles elementos, julgamos desnecessario maior numero de considerações sobre este ponto.

No quadro seguinte reunimos as cifras medias fornecidas por diversos autores sobre o numero normal das plaquetas no estado higido:

Media no de plaquets mm <sup>3</sup>	as por de plaqu	etas por	Autores
250.000	200.000 -	300 000	Hayem
250.000	200.000	300.000	Bizzozero
200.000	150.000 -	200 000	Sahli
250.000	130.000		Wright
216.000	183.000 -		Aynaud
210.000	180.000 -		Dettermann
200	210.000 -		Monzon
200.000	210.000	200,000	Fussari
200.000	200.000 -	300 000	Afanassiew
262.000	200.000	- 300.000	Buchmann
350.000			Thomsen
450.000			Pratt
284.000			Halisey
635.000	_	_	Brodie è Russel
300.000	200.000 -	- 500,000	Gram
	250.000 -		Deckwitz
-	263.000 -		Pizzini
-	250.000 -		Helber
-	192.000 -	0.000	Schenk
	174.000 -		Tchistowittch
	300.000 -		Kemp, Calhaum e Harris
-	700.000 -		Mackay
392.000	250.000 -		Fonio
250.000	150.000 -		Flössner
760.000 (ho		•	11
	ulher) -		C. Leake e Emmet Guy
_	280.000 -	- 760.000	Optiz
200.000	-	-	1070
269 000	-	- 1	0 Autor

#### CAPITULO VI

# TECNICA DE CONTAGEM DOS HEMA= TOBLASTOS

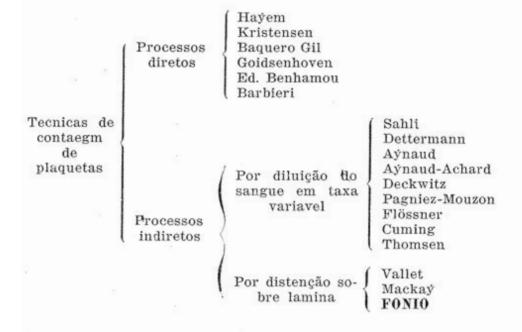
Após o descobrimento dos "globulins" por DON-NÉ, em 1844, muitos metodos para a sua contagem, uns mais complicados do que outros, foram introduzidos na tecnica hematologica. Diz AYNAUD, que o grande numero de metodos lhes indica a insuficiencia. Alguns hematologos, entre eles, TÜRK, crêm impossivel a contagem das plaquetas, contentando-se com um exame aproximativo sobre preparados fixados. Quasi todos os autores estão convencidos de que as plaquetas se podem contar com muita dificuldade, dada a tendencia de se reunirem em massa, isto é, de se aglutinarem. Devido também á sua grande viscosidade, os globulinos ficam aderentes ás paredes das pipetas hematimetricas.

O maior numero de processos atualmente empregados são devidos á tecnica indicada já em 1889 por Laker que propos fazer esta numeração em dois tempos: 1.º numeração dos globulos vermelhos pela tecnica comum; 2.º determinação do numero de plaquetas com relação aos globulos vermelhos, sobre uma gota de sangue misturado diretamente com o liquido de diluição sem intermediario de pipetas. Por uma simples regra de tres, obtem-se facilmente o numero de globulinos por mm³. A numeração das plaquetas pode-se fazer por processos diretos e por processos indiretos.

O processo direto consiste em fazer a contagem com sangue colhido diretamente do dedo ou lobulo da orelha e diluido já na propria pipeta conta-globulos, como se procede habitualmente na colheita das hematias e leucocitos, obtendo-se o numero de plaquetas por mm³, calculando-se de acordo com o tipo dos hematimetros.

O processo indireto consiste em estabelecer relação entre plaquetas e hematias ou leucocitos, contados numa diluição variavel com um liquido fixador que lhe conserve a morfologia, impeça a aglutinação, evitando o uso de pipetas. Este processo pode ser realizado em camaras conta-globulos, como a de Thoma ou outras, bem como após espalhamento do sangue numa lamina, fixando-o e corando-o.

No esquema que segue, procurámos anotar as tecnicas que conseguimos obter, através da bibliografia por nós consultada.



### PROCESSOS DIRETOS

# Tecnica de Hayem

Hayem foi o primeiro a fazer a contagem dos hematoblastos. Para diluir o sangue utilizou primeiramente o liquido aniotico iodado de Max Schultz e urina diabetica cuja densidade era de 1039 acrecida de 6 % de agua oxigenada a 12 %. Devido á dificuldade de se obter em ambos os liquidos e não se prestando o seu conhecido liquido (agua distilada 200 cc. — cloreto de sodio 1 gr. — sulfato de sodio 5 grs. — bicloreto de mercurio 0,50) para a contagem dos hematoblastos, Hayem em 1877 substituiu o bicloreto de mercurio por 3,5 cc. da solução iodo-iodetada.

# A composição da solução é a seguinte:

Agua distilada	200	cc.
Cloreto de sodio	1	gr.
Sulfato de sodio	5	grs.
Sol. iodo-iodetada	3,5	cc.



Agua	distilada	 . 100	cc.
	de potass	 	grs.
Iodo n	netalico	 . 1	gr.

Deve o liquido ser preparado recentemente, pois o iodo se evapora bastante rapidamente, mesmo em frascos fechados com rolha de esmeril.

Descreveremos o hematimetro de Hayem e a tecnica para a contagem dos hematoblastos.

O hematimetro compõe-se de uma celulas de vi-

dro calibrado, da profundidade de ½ de milimetro, suportada por uma platina de metal sob a qual se coloca um tubo com um quadriculo com um sistema otico que projeta a imagem desse quadriculo sobre o fundo da celula. Uma pipeta graduada para o sangue; uma pipeta para a solução diluidora; um recipiente com agitador para a mistura; um tubo de borracha e laminulas inflexiveis para recobrir a celula. A solução de Hayem e para os hematoblastos a solução iodo-iodetada descritas linhas atrás.

A numeração dos hematoblastos compreende tres fases: 1.º a diluição do sangue a um titulo definido; 2.º a numeração num volume conhecido da mistura; 3.º o calculo dos hematoblastos em 1 milimetro cubico de sangue.

Tecnica — Com grande pipeta á qual se adata um tubo de borracha, medem-se 500 mm³ do liquido diluidor, aspirando este até o traço ½ e derrama-se no recipiente. Com a pipeta capilar recolhem-se 2 mm³ de sangue aspirando até o traço 2, após desinfecção e picada do dedo. Enxuga-se a extremidade da pipeta com um pano ou uma camurça; é necessario operar com muita precisão e rapidez. A extremidade da pipeta é mergulhada no liquido diluidor e expele-se o sangue; para bem esvasiar a pipeta aspira-se duas ou tres vezes um pouco de liquido que logo repelimos na proveta. Com o agitador imprimem-se movimentos rotatorios para bem homogeneizar a suspensão.

Quando a suspensão estiver homogenea, imediatamente pratica-se a numeração, com o fim de evitar a evaporação do liquido de diluição que possa modificar os resultados.

Coloca-se o hematimetro sobre a platina do microscopio e leva-se ao centro do campo o quadriculo. Com o agitador deposita-se uma gota de suspensão bem agitada, no meio da celula do hematimetro, tomando cuidado para que a gota não toque os bordos da celula. Depois colocamos a laminula com cuidado sobre a gota e introduz-se um pouco de liquido que se espalha por capilaridade entre a celula e laminula de modo a impedir a evaporação.

Obtem-se assim uma camada de liquido de superficies paralelas, espessa de <sup>1</sup>/<sub>5</sub> de milimetro. Por outro lado o sistema de lentes do hematimetro projeta sobre o fundo da celula um quadrado de 1/5de milimetro de lado. Observa-se pois um cubo de 1/5 de milimetro de lado. Focam-se e contam-se os hematoblastos. Para esta operação emprega-se um aumento forte. O grande quadrado projetado sobre o fundo da celula, é, para maior comodidade, subdividido em 16 pequenos quadrados. A numeração fazse em cada um dos quadrados, somam-se em seguida os 16 algarismos obtidos. A numeração deve ser repetida num bom numero de grandes quadrados (20-60), deslocando-se as celulas do hematimetro nos sentidos transversal e perpendicular. Somam-se depois, os numeros obtidos e tira-se a media. Sendo pois conhecida a media de hematoblastos contidos no grande quadrado, para deduzir o numero de hematoblastos em 1 mm3 de sangue, é suficiente multiplicar por 31.000.

A explicação do numerador 31.000 é o seguinte: a grande pipeta, tendo em geral 6 mm³ de humedecimento, os 500 mm³ tomados com essa pipeta forneceu 494, aos quais ajuntam-se 2 mm³ de sangue. O volume total sendo de 496 mm³, donde 2 de sangue, a diluição é de 248°. Ainda mais, a numeração sendo feita num cubo de ½ de mm.; em um cubo de 1 mm., tem aí 125 cubos de ½ de mm.

É suficiente pois multiplicar o numero de hematoblastos obtidos, por 248x125 ou simplesmente por 31.000.

### Tecnica de Kristensen

Kristenson conta as plaquetas no hematimetro. O sangue dilue-se a 1:10, numa pipeta para globulos brancos, com o seguinte liquido:

Citrato de sodio	2, 5
Cl. mercurico	0,005
Azul brilhante de cristal	0, 5
Agua distilada	500,0

Antes do emprego acrescenta 2,5 por cento deuréa.

O sangue é colhido por picada do dedo, aspirando-se depois até o traço 1 e completando com o liquido diluidor até o traço 11. O sangue fica na pipeta durante 10 minutos, findos os quais se enche a camara conta-globulos, p. ex. a de Troma. Faz-se a contagem no fim de meia hora. As hematias são destruidas, ficando intatos os hematoblastos e os globulos brancos.

Segundo a opinião de Piney, este liquido é excelente para diluir o sangue, para a contagem dos leucocitos; as celulas ficam tão bem córadas, que pode-se fazer uma formula leucocitaria normal bastante exata.

# Tecnica de Baquero Gil

Baquero Gil, depois de alguns ensaios preliminares, modificou a solução Kristensen, aumentandoa quantidade de uréa, que torna mais visivel as plaquetas, diminuindo o citrato de sodio para hemolisar mais facilmente as hematias e aumentando bastante a quantidade de cloreto mercurio que favorece a rapida sedimentação dos corpusculos na camara de contagem. A formula é a seguinte:

Uréa	17, 5-20	grs.
Citrato de sodio	2,	grs.
Sublimado	0,05	
Azul brilhante de cresilio	0, 5	
Agua distilada	500	cc.
Filtrar.		

Aconselha Baquero Gil, puncionar o dedo, estando este bem quente, com picada ampla ou dupla, que faça fluir o sangue abundante e espontaneamente. Aspirar o sangue com pipeta para globulos brancos até o traço 1, completando com a solução até o traço 11. Misturar imediatamente. Durante 20 minutos agitar a pipeta de quando em vez. Desprezando-se as primeiras gotas, coloca-se uma na camara de Thoma, deixando horizontalmente uns 15-20 minutos antes de fazer-se a contagem. Não começar esta, emquanto a distribuição nos quadrados não fôr uniforme. O calculo é o mesmo usado para a contagem dos leucocitos, isto é, multiplicar o numero de plaquetas encontradas por 100, uma vez que se contem todos os 400 quadradinhos.

### Tecnica de Van Goidsenhoven

Repousa esta tecnica essencialmente sobre a lise dos globulos vermelhos por uma solução de uréa, respeitando os globulos brancos e as plaquetas.

Compõe-se o liquido de diluição, devido a Mlle.

A. Van Herwerden, de 21 partes de solução de uréa a 10 % e 9 partes de cloreto de sodio a 9 %. Esta solução deve ser preparada extemporaneamente e filtrada no momento de ser usada.

Para maior comodidade, aconselha o autor preparar de antemão papeis com 0,50 de uréa cada um. Para isso bastará dissolver em 5 cc. de agua distilada para se obter a solução de uréa a 10 %.

Destes 5 cc. tomar-se-ão 3 ½ cc. que se misturam com 1 ½ de sôro fisiologico a 9 por mil. Filtrase, estando a solução assim pronta para ser usada.

Tecnica — Aspira-se na pipeta de globulos brancos até o traço 0,5, o sangue obtido por picada da ponta do dedo, e depois o liquido de diluição até o traço 11, obtendo-se uma diluição de sangue a <sup>1</sup>/<sub>20</sub>. Espera-se de 20 a 30 minutos depois de ter introduzido uma gota da mistura no hematimetro.

Deve-se manejar constantemente o parafuso micrometrico afim de descobrir seguramente todas as plaquetas; estas acham-se bem isoladas e se reconhecem facilmente, si se tem o cuidado de bem conduzir a iluminação.

Contar as plaquetas em 80 pequenos quadradinhos da camara de Thoma. O numero encontrado, multiplica-se por mil, pois a diluição foi a <sup>1</sup>/<sub>20</sub> e teremos o numero de plaquetas por milimetro cubico de sangue.

# Tecnica de Benhamou

E. Benhamou, procurou melhorar ainda a tecnica de Van Goidsenhoven acrescentando ao liquido de diluição, um corante vital, o azul brilhante de cresilico tornando as plaquetas particularmente visiveis. Eis a formula da mistura que Benhamou prepara extemporaneamente para a contagem:

Uréa	0,50
Agua distilada	
Cl. sodio 9 %	1,2 cc.
Azul brilhante de cresilio	
Filtrar sobre papel.	170 100 10

Tecnica — Aspira-se o liquido de diluição numa pipeta para globulos brancos, até o traço 0,5. Faz-se uma picada no dedo e mergulha-se rapidamente a extremidade da pipeta na gota de sangue; aspira-se até que a mistura atinja o traço 1. Aspira-se de novo o liquido de diluição até o traço 11 da pipeta. A goticula só será introduzida na camara de numeração (de preferencia uma celula de Bürker) após ter-se agitado vagarosamente a pipeta e expulso quasi a metade de seu conteudo. A numeração é feita depois de 20 minutos de sedimentação: as plaquetas aparecem coradas mais ou menos fortemente de azul e destacamse nitidamente sobre o fundo claro de preparação, não podendo ser confundida nem como hemoconios, nem com os grãos de poeira acidentais que poderiam sujar a celula; estão na maior parte imoveis e si certas plaquetas ainda conservam alguma mobilidade, seus movimentos diminuidos não perturbam a numeração.

Deve ter-se o cuidado de movimentar constantemente o parafuso micrometrico, afim de contar seguramente todas as plaquetas. Como indicou Goidsenhoven, contam-se 80 quadrados da celula de Bürker sejam 13 agrupamentos de quadrados mais 2 quadrados. Sendo a diluição do sangue ao vigesimo, tendo o pequeno quadrado da celula de Bürker, um volume <sup>1</sup>/<sub>4000</sub> de mm³, é suficiente multiplicar por 1.000 o numero obtido, para se ter o numero de plaquetas por mm³ de sangue.

#### Tecnica de Barbieri

Barbieri, para tornar mais pratica e mais rapida a contagem das plaquetas, emprega uma solução do tipo Aynaud-Foti, levemente modificada, cuja composição é a seguinte:

Citrato de sodio 1	gr.
Cloreto de sodio 0	), 45
Sulfato de sodio 2	grs.
Formol comercio 1	cc.
Agua distilada 5	0 cc.
Azul metilenio q. s. para corar intensa	mente.
Filtrar o liquido antes do primeiro	

Tecnica — Com uma pipeta conta-globulos vermelhos, aspira-se a solução supra até o traço 0,5. Fazse a picada do dedo, após desinfecção com uma solução de sublimado a 1 por mil, pois o alcool retrai muito os tecidos. Imediatamente a pipeta é mergulhada na gota de sangue e aspira-se até que a coluna de liquido diluidor atinja o traço 1. Depois de retirar com um algodão o excesso de sangue da extremidade da pipeta, tendo todo o cuidado, para que se conserve sempre no mesmo nivel o sangue dentro do capilar da pipeta. Rapidamente aspira-se de novo o liquido diluidor até o traço 101 agitando-se com a maxima celeridade a pipeta. Após desprezar as primeiras gotas, coloca-se uma na camara de Thoma ou de Bürker, como para uma contagem de globulos vermelhos. Espera-se dez minutos para dar tempo aos elementos sanguineos de se sedimentarem.

Procede-se depois á contagem das hematias e das plaquetas que se encontram em dez retangulos caso a camara usada fôr a de Bürker. Sendo a diluição a 0,5, multiplicando-se o numero correspondente ás plaquetas e as hematias contidos nos dez retangulos, respetivamente por 20.000 se obtem a cifra desses elementos por mm³ de sangue.

Para maior precisão, pode ser executada á parte a contagem dos globulos vermelhos. Nesse caso, com uma simples relação remonta-se ao numero de plaquetas por mm³. Admitindo-se que sobre 200 eritrocitos se contaram 16 plaquetas e que o numero de hematias é de 5:000.000, teremos como resultado . . . . . 400.000 hematoblastos, segundo a seguinte proporção:

16:200 :: x : 5.000.000(  $x = n.^{\circ}$  de hematoblastos por mm<sup>3</sup> )

#### PROCESSOS INDIRETOS

#### Tecnica de Sahli

Sahli utiliza-se da solução de sulfato de magnesio a 14 %, á qual mistura certa quantidade de violete de metilio, de tal modo que posta em um tubo de 10 cc. apareça ainda bastante transparente. Assim, as plaquetas mantem-se isoladas e coram-se fazendose facilmente a determinação de sua proporção com os globulos vermelhos na camara conta-globulos.

A tecnica é a seguinte: Depois de limpa cuidadosamente a extremidade de um dedo, deposita-se uma gota da solução de sulfato de magnesio com violete de metilio, sobre a pele. Punciona-se no meio da mesma gota de tal modo que o sangue ao saír, se misture imediatamente com a solução. Aspira-se logo com a pipeta para globulos vermelhos, agitando para obter uma suspensão homogenea. Coloca-se uma gota na camara de Thoma ou outra, calculando a proporção relativa entre as hematias e as plaquetas. A quantidade absoluta das plaquetas será deduzida depois da contagem dos globulos vermelhos pelos processos comuns.

### Tecnica de Dettermann

Deposita-se sobre a polpa do dedo, previamente lavado, uma gota da seguinte mistura:

Sol. de cloreto de sodio a 1 % } partes
" " bicromato de potassio 5 % } iguais

Faz-se através desta gota a picada. O sangue mistura-se com a solução. Leva-se depois uma gota desta mistura á camara de Thoma, procedendo-se á contagem que é facilitada pela coloração leve com que se apresentam os hematoblastos.

É um processo muito defeituoso, não se prestando para uma determinação rigorosa.

# Tecnica de Degkwitz

Para a numeração das plaquetas começa-se por determinar o numero de globulos vermelhos, pelos processos habituais, fazendo-se depois uma preparação das plaquetas, e da relação entre o numero das hematias e o das plaquetas, deduziremos a quantidade total destas:

São necessarias as seguintes soluções:

1.°	Fosfato de sodio	. 2 grs.
	Cloreto de sodio	. 1 gr.
	Formol (40 %)	. 3 cc.
	Agua distilada	. 100 grs.

(Conserva-se bem, durante 4 semanas aproximadamente).

2.°	Agua distilada	100	grs.
	Cloreto de sodio		
	Formol (40 %)	3	cc.
	3 n/2 Fosfato de sodio	2.5	CC.

Á esta solução que se altera bastante rapidamente, acrecenta-se 1 gr. de fenolftaleina, com a qual poderemos observar si a alcalinidade do liquido diminui (pelo impalidecimento da côr vermelha deste). Quando tal se der, restabelecemos o grau de alcalinidade da solução adicionando um pouco de tri-fosfato de sodio. São guardados em frascos conta-gotas de côr escura.

Tecnica — Em uma cuba misturadora (Catalogo Leitz. 46 E. Fig. 340), misturam-se por meio de uma agulha 5-6 gotas da solução 2.ª com azul de cresilio brilhante até que a solução apareça completamente escura vista por transparencia. Depois se depositam 3 gotas da solução 1.ª sobre uma lamina parafinada. Faz-se a picada do dedo, depois de bem limpo desprezando-se a primeira gota de sangue. Põe-se imediatamente a segunda, nas 3 gotas da solução 1.º, com a qual se mistura dando golpes energicos sobre o bordo da lamina.

Verte-se esse liquido por cima do que contém a cuba misturadora, procurando misturar ambos, á custa de suaves movimentos da cuba. Toma-se em seguida com um bastão de vidro, uma gota da mistura, coloca-se numa camara contra-globulos (Thoma p. ex.) e cobre-se com uma laminula fina. A gota deve ser suficientemente pequena para não ultrapas-sar o reticulo da camara e caír na cavidade circular

que a rodeia. Após 20 minutos começa-se a fazer a contagem mediante uma objetiva de imersão.

Contam-se as hematias, assim como as plaquetas, e sendo conhecido o numero de hematias por mm<sup>3</sup>, feito pelos processos normais, é facil calcularmos o numero de plaquetos por mm<sup>3</sup>.

Cada plaqueta deve estar separada das demais. As preparações em que duas plaquetas se aglutinam não são aproveitadas. Tem-se que ter muito cuidado para que a gota sanguinea não seja demasiadamente grossa, e que a solução conserve a devida alcalinidade.

Em uma solução bem feita, mostra-nos os globulos brancos intensamente corados. Si a solução é demasiadamente acida ficam sem corar as hemacias, pelo contrario si é demasiadamente alcalina tomará uma côr azul escura, emquanto que os globulos brancos se coram muito palidamente.

O numero de plaquetas no homem adulto é de 300.000 por mm³ em media.

# Tecnica de Aynaud

A colheita do sangue será feita numa veia da prega do cotovelo, depois da limpeza sumaria da pele, evitando os antiseticos e o alcool. É absolutamente inutil fazer compressão do braço e deve ser formalmente contra-indicada. Nos casos dificeis póde-se fazer uma leve compressão normal por um auxiliar, que será abandonada logo que o sangue penetre na seringa. O instrumental é o seguinte: uma seringa de 5 cc.; agulhas de aços, curtas e com uma alma bem larga, para dar escoamento rapido e o minimo de contato com substancia tão nociva para os globulinos como é o metal. Devem ser rigidas com 15 mm. de comprimento e 1mm7 de diametro pouco mais ou menos.

A agulha deve penetrar de um só golpe na veia e não sofrer depois nenhum deslocamento.

Carrega-se a seringa com uma solução esterilizada de citrato de sodio a 10 % e aspiram-se 2 a 3 cc. de sangue que se derramam num tubo de vidro. Depois de agitar muito bem retira-se a seringa e com uma pipeta para globulos vermelhos colhe-se o sangue para a contagem de hematias pelos processos comuns, no orificio posterior da agulha por onde está o sangue a correr.

O sangue citratado é em seguida diluido de maneira a tornar a numeração possivel, na solução seguinte que conserva todos os elementos do sangue:

Citrato de sodio . . . . . 10 grs.
Colreto de sodio . . . . . 5 grs.
Agua distilada q. s. p. . . 500 cc.
Acrescentar 10 cc. de formol do comercio.

A quantidade de sangue citratado ajuntada ao liquido de diluição deve dar á mistura uma côr levemente rosea. A diluição deve ser aproximadamente aquela das numerações comuns dos globulos vermelhos, isto é, ao centesimo. Como se trata sómente de determinar uma relação, as proporções podem variar. Mistura bem feita deverá dar no minimo, nos 16 grandes quadrados da camara de numeração de Thoma, 1.200 a 1.500 globulos vermelhos.

Antes de proceder á numeração, temos de nos certificar de que no sangue citratado não diluido, as plaquetas não estejam aglutinadas. Em caso de aglutinação, deverá fazer-se nova colheita de sangue.

Agitar bem a mistura antes de retirar uma gota que será colocada na camara de Thoma e coberta depois com uma laminula plana. Esperar um quarto de hora, para deixar o sangue se sedimentar. A preparação será examinada com uma objetiva 6 ou 7, iluminação com espelho plano, sem condensador de Abbé, diafragmando fortemente.

Os globulinos depositados sobre o fundo das celulas aparecem sob a forma de pequenos discos extremamente palidos. Estão isolados e têm uma forma tipica e regular que os torna inconfundiveis com todo outro elemento do sangue. Não se observam os precipitados, as coagulações, que se encontram nas numerações de sangue cutaneo.

Contam-se todos os globulos vermelhos e globulinos contidos nos 16 grandes quadrados da camara de numeração. Dividindo o total dos globulos vermelhos, pelo total dos globulinos, obtem-se a relação — É suficiente dividir o numero dos globulos vermelhos, fornecidos por um dos metodos usuais, por — , para se ter o numero de globulinos por mm³ de sangue.

No homem adulto, constata-se uma media de 210.000 globulinos por mm³ de sangue e a relação — 6 de 20,75.

# Tecnica de Achard-Aynaud

Achard, modificou a tecnica de Aynaud, procurando reduzir a quantidade de sangue colhido da veia.

Tecnica — Com uma seringa de Pravatz, previamente parafinada, contendo 0,1 cc. de uma solução de citrato de sodio a 10 %, aspira-se 0, 9 de sangue por punção da veia do cotovelo. Mistura-se bem e faz-se caír uma gota em vidro de relogio tambem parafina-

do, contendo 2 cc. da solução A e logo em seguida 2 cc. da solução B, misturando tudo muito bem.

Depois coloca-se uma gota desta mistura numa punção da veia do cotovelo. Mistura-se bem e faz-se contagem das hematias e das plaquetas, calculando estas com referencia ao numero de hematias.

Sendo conhecido o numero de hematias por mm<sup>3</sup> empregando os processos usuais, é facil obter o numero de plaquetas por mm<sup>3</sup>.

# Sol. A

Solução citrato de sodio a 1 % .... 20 cc. Solução de cloreto de sodio 0,80 .. 80 cc.

## Sol. B

Solução clor. sodio a 0,80 . . . . . . 80 cc. Formol do comercio . . . . . . . . . . 20 cc.

# Tecnica de Pagniez-Mouzon

A tecnica de Pagniez-Mouzon é baseada no mesmo principio da de Aynaud e outras, isto é: Obtemse uma relação entre as hematias e hematoblastos contidos numa diluição do sangue extemporaneo, e, conhecendo por numeração previa o numero de gl. vermelhos por mm³ deste mesmo sangue, estabelecer, pois simples calculo comparativo, o numero de hematoblastos que deve conter por mm³ o sangue submetido a esse exame.

Tecnica — Faz-se previamente enumeração dos globulos vermelhos do sangue segundo os processos usados. Depois, faz-se diluição do sangue com taxa desconhecida deixando caír 4-5 gotas, diretamente

da picada do dedo num pequeno recipiente, bastante largo, contendo uma certa quantidade — 10 cc. — de liquido de Marcano ou a solução seguinte:

Citrato de sodio	2,0	
Cl. de sodio	1,0	
Formol de comercio	2	cc.
Agua distilada q. s. p	120	cc.

Coloca-se, depois de tornar bem homogenea a suspensão de hematias, uma gota, na camara de contagem do hematimetro de Thomaz. Cobre-se com uma laminula. Deixa-se repousar alguns minutos. Contam-se depois quantas hematias e quantos hematoblastos existem num mm³ desta suspensão. Temos assim uma relação entre os globulos vermelhos do sangue por mm³, temos, estabelecendo-se a relação, o numero de hematoblastos por mm³ de sangue:

Para maior clareza, exemplificaremos:

Si por ex.: as hematias do sangue são em numero de 3.840.500 p. mm³ e si num mm₃ de uma diluição extemporanea do sangue, nós contamos 1.400.000 hematias e 82.000 hematoblastos, nos temos, segundo a formula:

$$x = \frac{3.840.500 \times 82.000}{1.400.000} = 224.944 \text{ hemat. p. mm}^3$$

## Tecnica de Flössner

Em um bloco de parafina forma-se uma depressão mediante um tubo de ensaio cheio de agua bem quente. Derramam-se em excavação XXX gotas de solução de Tyrode, repetidamente filtrada atraves de filtro endurecido e VI gotas (si se trata de mulher, V gotas e si de crianças, III) de uma solução de sublimado e cloreto de sodio (tal como se encontra nos comprimidos oficiais) á 1 por mil, também filtrada atraves de filtro endurecido.

A solução de Tyrode é constituida de 0,8 % de cloreto de sodio, 0,02 % de cloreto de potassio, 0,02 % cloreto de calcio, 0,1 % de bicarbonato de sodio, 0,005 % de fosfato de sodio, 0,1 % de glicose. Para a contagem das plaquetas suprime-se a glicose. A solução de Tyrode, do ponto de vista de sua concentração em hidrogeniontes (pH-7,41), é quasi identica á do sangue (pH-7,37) e por isso torna-se muito apropriada para a conservação dos globulos vermelhos e plaquetas.

Tecnica — Pratica-se a punção algo profunda na polpa do dedo, cuidadosamente limpo com eter e deixa-se caír a primeira gota na solução, agitando imediatamente com uma varinha de cristal, cuja extremidade inferior se encontra coberta de cera de carnauba, até que o liquido apareça homogeneo. Com a mesma varinha de cristal coloca-se uma gota da mistura na camara conta-globulos, que se fecha em seguida com uma laminula.

A segunda e terceira gota de sangue obtida, utilizam-se para a numeração de eritrocitos e leucocitos. Primeiro contam-se às plaquetas, logo os eritrocitos nos mesmos campos, e depois de novo as plaquetas. As plaquetas devem-se procurar em diferentes alturas girando o parafuso micrometrico. Quando se encontrou a proporção entre plaquetas e eritrocitos, determina-se a cifra absoluta de eritrocitos pelos metodos usuais. Deste modo poderá calcular-se facilmente o numero absoluto de plaque-

tas. A cera de carnaúba deve ser filtrada antes de aplica-la como revestimento da varinha. O recipiente formado na parafina e o revestimento da varinha com cera de carnaúba têm por fim oferecer ás plaquetas a menor superficie possivel de aderencia. Todas essas manipulações devem praticar-se com grande rapidez e limpeza.

## Tecnica de J. N. Cumings

Flössner para a contagem dos hematoblastos lançou mão da solução de Tyrode, substituindo a glicose por uma solução salina a 1 % de sublimado. Em vista dos bons resultados colhidos por Flössner com esta solução J. N. Cumings, também usou-a para a contagem das plaquetas após ligeira modificação.

A solução de Tyrode modificada por Cumings é a seguinte:

Cloreto mercurico	0,10	Cloreto de calcio	0,20
Fosfato monosodico	0,15	Cloreto de sodio	8,0
Bicarbonato sodio	1,0	Cloreto de potassio	0.20
		Cloreto de magnesio	0,10

A adição de cloreto mercurico tem por fim prevenir qualquer proliferação microbiana. As 5 partes da solução supra, junta-se 1 parte de sublimado a 1 %, imediatamente antes do uso e sem filtrar o liquido.

O sangue é obtido da orelha, por picada, gotejando-se o sangue no liquido dluidor descrito acima, tendo o cuidado de deixar pingar o numero de gotas quantas fôrem as do liquido.

O sangue deve correr diretamente dentro do liquido diluidor, o qual se encontra em uma pequena tijela de parafina (pouco mais ou menos de 1 polegada de comprimento, ½ de largura e ¾ de altura) sem fazer nenhuma pressão local. Por meio de um pedaço de tubo de vidro revestido por dentro e por fora com parafina através do qual o ar pode ser assoprado por meio de um tubo de borracha, mistura-se o conteudo completamente. O grau exato de diluição é aquele que por experiencia mostrou dar a maior facilidade de enumeração. A diluição original do sangue deverá ser pois tal que permita obter mais ou menos 150 globulos vermelhos por campo.

Uma vez colhido o sangue na tijela conforme foi descrito acima, seca-se cuidadosamente a orelha, e, após ligeira pressão, retira-se o sangue para a contagem das hematias que é feita pela maneira comum.

Por intermedio de um misturador de vidro, coloca-se uma gota do sangue diluido na camara de contagem e aplica-se uma laminula por cima. Depois que os globulos vermelhos e as plaquetas se tiverem sedimentado, (usualmente em dez minutos) contamse os hematoblastos contra os globulos vermelhos, enumerando-se um milhar dos ultimos, com uma ocular de alta potencia e objetivas secas. A contagem executar-se-á sempre dentro de meia hora após a colheita. A camara citometrica deverá ser feita es= pecialmente para a contagem dos hematoblastos e cuidadosamente limpa antes do uso. Uma gota do liquido diluidor deverá ser examinada antes da colheita do sangue, para verificar-se que não estão presentes particulas livres que possam assemelhar-se aos hematoblastos.

Os hematoblastos são facilmente reconhecidos como particulas de alto poder refringente, variando em tamanho de pouco mais ou menos ½ a ½ do diametro de um eritrocito. A sua forma é redonda, oval, oblonga com angulos bem definidos, não mostrando

tambem movimentos uma vez que foram depositados na camara citometrica. Algumas vezes podem ser vistos apendices, tais como descreve Watson resultantes da degeneração de hematias, podendo-se assemelharem a plaquetas.

Os hematoblastos podem ser algumas vezes vistos aparentemente proeminando de um globulo vermelho como notou Schilling.

#### Tecnica de Olef Thomsen

Em 1918 Olef Thomsen introduziu para a contagem das plaquetas uma nova tecnica, que tornou o processo de resultados muitissimo mais seguro do que antes.

Tal tecnica, em resumo, é a seguinte (ligeiramente modificada em relação ao metodo original).

Em um tubo de centrifugar, de 5 cc., graduado em decimos de cc. medem-se 0,5 cc. de uma solução a 10 % de citrato de sodio. Com uma agulha afiada e não estreita demais, faz-se a punção venosa, deixando correr para dentro da solução 4,5 cc. de sangue, que se misturam, arrolhando e sacudindo o tubo. O sangue, que adere á rolha, limpa-se com um pedaço de tecido, com papel de filtro, e o tubo fica em repouso por uma hora aproximadamente.

Em todos os casos, os leucocitos bem como as hematias, foram precipitados de forma a deixar uma camada de plasma turbido contendo as plaquetas numa suspensão homogenea e muito estavel, a qual não sofre qualquer alteração num periodo minimo de 5 horas. Uma pequena quantidade dessa mistura é retirada então, com um misturador comum de hematias e diluida na proporção de 1:20 com uma solução que tem 9 por mil de cloreto de sodio e 2 por mil de

formol, possivelmente tambem uma pequena quantidade de azul brilhante de cresilio afim de corar as plaquetas.

Uma gota de diluição do plasma é colocada numa camara de Thoma, Bürk ou outra. Modelo de camara aberta não se deve usar, por causa da evaporação.

Na diluição, as plaquetas sedimentam prontamente e podem ser contadas após um repouso de ½ hora a 1 hora. Mostram-se elas como pequenos corpos refringentes, duma côr azul, de baixa tonalidade.

Contam-se 10 quadrados grandes e dividindo-se o total por 2, acha-se o numero de plaquetas (em milhares) contidas em 1 cc. de plasma citratado.

Quando se conhece a relação entre o sangue citratado e o volume das celulas do sangue, torna-se muito facil calcular o numero de plaquetas por milimetro cubico de sangue.

Segundo Oluf Thomsen, centrifugando-se o sangue por 10 minutos a 2.000 revoluções por minuto, o precipitado ainda contem 5 % de plasma.

O calculo é então feito pela formula seguinte, ou multiplicando-se por uma constante (coeficiente), e calculada para cada valor do precipitado:

Cont. de plaq. = 
$$\frac{\text{(Sangue citratado} \div \text{precipitado})}{\text{Sangue citratado} \div \text{citrato}} \times \frac{\text{plaq. p. mm}^3 \text{ plasma}}{\text{Sangue citratado} \div \text{citrato}}$$

O erro causado por uma menos rigorosa determinação do volume das celulas, não é grande, como mostra o exemplo seguinte:

Sangue citratado 
$$=$$
  $\frac{0,5}{4,5}$  a) precipitado depois 15 minutos centrif.  $-2$  cc.  $\frac{1}{4,5}$  cc.

Contadas 500.000 plaquetas por mm³ de plasma citratado.

Calculo da contagem das plaquetas:

por a) = 
$$333.000$$
 por mm<sup>3</sup>  
por b) =  $355.000$  por mm<sup>3</sup>

#### Tecnica de Vallet

Deposita-se na polpa do dedo uma gota de acido osmico a 1 por 100. Faz-se a picada no centro dessa gota. Uma goticula dessa mistura é colocada na extremidade de uma lamina e espalha-se, seca-se e cora-se pelo Giemsa. Os hematoblastos são numerados em relação com os leucocitos que foram tambem contados pelos processos usuais.

### Tecnica de Mackay

Para a contagem das plaquetas Mackay usa as seguintes normas:

a) Liquido diluidor:

Citrato de sodio	2 grs.
Cloreto de sodio	0,29
Agua distilada	100 cc.

Antes de ser usado, aquecer até a ebulição, filtrar e resfriar.

- b) Alça de platina: ¼ de polegada de diametro, revestida com parafina dura, limpa.
- c) Agulhas retas de Hagedorn.
- d) Laminas limpas, sobre a qual coloca-se previamente uma gota duma solução saturada

de azul brilhante de cresilio em alcool absoluto. O alcool, então evapora-se e uma fina pelicula de córante precipitado é desse modo depositada sobre a lamina.

e) Laminula n.º 1, limpa de 1/8 de polegadas quadradas.

Tecnica — A pele sobre a polpa dum dedo é limpa com alcool absoluto e deixa-se secar. Uma gota do liquido diluidor, é então colocada sobre a pele e esta puncionada agudamente através da gota. Deixa-se então correr o sangue livremente através dessa gota de liquido diluidor, sem se fazer pressão alguma. Toma-se o cuidado de assegurar que o sangue seja diluido de tal modo que, em cada campo microscopico, não aparecam mais de 60 hematias. Na pratica o numero de hematias presentes é aproximadamente de 40 por campo. O sangue e o liquido diluidor são perfeitamente misturados por meio de uma alça parafinada, e uma alça cheia dessa mistura é transferida para o centro da pelicula de precipitado de azul brilhante de cresilio sobre a lamina. Cobrese então com uma laminula e unta-se com vaselina. O total do sangue diluido transferido para a lamina é tal que o liquido se espalha por capilaridade entre a lamina e laminula. Duas preparações são feitas e ambas permanecem por uns 30 minutos na temperatura ambiente do laboratorio, para permitir a sedimentação dos elementos sanguineos. Durante esse periodo as hematias e os leucocitos no sangue serão contados pelos processos usuais.

Toda a observação será feita com imersão (objetiva <sup>1</sup>/<sub>12</sub>, ocular n.º 4). Para fins de contagem o campo microscopico será dividido em quadrantes o que se consegue convenientemente cortando dois aneis de papelão de tamanho adequado e colando um

ao outro depois de esticar entre dois fios de fino cabelo em angulo reto. Esse conjunto é então inserido dentro da ocular.

Toda a preparação na qual ocorre aglutinação de plaquetas deve ser desprezada. A relação entre plaquetas e hematias será determinada numa serie de campos sucessivos, sendo contadas um total de 1.000 hematias em cada uma das duas laminas. O numero medio de plaquetas por mil hematias é então determinado pelos resultados obtidos de cada lamina e pelo numero previamente calculado de hematias, obtem-se o numero de plaquetas por mm³.

#### Tecnica de Fonio

- 1.º Empregar laminas novas absolutamente limpas e bem desengorduradas, o que se consegue, lavando-as com agua e sabão. Depois de bem enxaguada, secar e conservar em frascos de boca larga contendo alcool e eter em partes iguais, retirando-se sómente no momento de usar, tendo o cuidado de não tocar com os dedos, para evitar que se engordure novamente.
- 2.º A colheita do sangue deve ser feita no dedo medio. Sobre o bordo do dedo, por cima da ranhura ungueal, coloca-se uma gota de tamanho regular de uma solução de sulfato de magnesio a 14 por cento, após desinfecção cuidadosa da pele com eter.
- 3.º Punciona-se levemente a pele através da gota de sulfato de magnesio, com uma lanceta de vacinação ou uma agulha de Bensaude ou mesmo com uma simples pena de escrever, de que se rompe uma das pontas. Espontaneamente ou fazendo uma ligeira pressão, o sangue deverá saír em gota tão pequena que, ao misturar-se com a solução de sulfato

de magnesio mantenha uma proporção aproximada de 1 a 2 por 10.

- 4.º Agita-se rapidamente a mistura e com a propria lanceta ou com fino bastão de vidro, deposita-se uma gota numa das extremidades da lamina.
- 5.º Pratica-se então a extensão. Segura-se a lamina, entre o dedo polegar e o medio da mão esquerda, de modo que a gota da mistura sangue-sulfato fique para a direita. Toma-se com a direita uma lamina de bordos bem polidos na qual se cortou os dois angulos, estreitando assim o lado fino, para evitar que a extensão chegue aos bordos da lamina.
- 6.º Aproxima-se a lamina que está na mão direita, da gota de mistura sangue-sulfato, dando á lamina uma inclinação de 45º mais ou menos. Após a gota ter se extendido por capilaridade ao longo do bordo da lamina, se deslisa uniformemente, com rapidez e firmeza, de tal forma que a gota seja arrastada sem sofrer esmagamento algum. Uma boa preparação deve ser a que o sangue não chegue aos bordos da lamina na qual foi feita a extensão.
- 7.º Secagem da extensão no ar. Ativa-se a secagem imprimindo á lamina movimentos de vaí e vem.
- 8.º Coloração. A coloração por nós usada é a panoptica de Pappenheim, cuja tecnica é a seguinte: a preparação não fixada é tratada durante 3 minutos pelo liquido de May-Grünwald puro que atua sómente como fixador. Acrecenta-se um igual volume de agua distilada e deixa-se agir durante 1 minuto a solução hidro-alcoolica assim obtida. A coloração produz-se por dissociação e ionização do córante neutro. Depois de 1 minuto e despreza-se o corante e sem lavar, colocar a preparação durante 1 hora para obter uma supercoloração das plaquetas, no liquido

de Giemsa diluido na proporção de 15 gotas para 10 centimetros cubicos de agua distilada. Lavar e secar bem.

9.º — Contagem das plaquetas — Examina-se a preparação seca com objetiva de imersão e a ocular de Erhlich. Gradua-se a abertura do diafragma da ocular de tal maneira que se contem mais ou menos 50 hematias por campo. Começa-se então a contagem das hematias contidas no campo visual e depois as plaquetas (por exemplo: hematias 34, plaquetas 3); desloca-se sempre a preparação para outro campo visual e somam-se os valores encontrados até obter 250 hematias e X plaquetas. Deste modo examinam-se 4 pontos diferentes da extensão, o mais espalhado possivel ou seja 4x250 — 1.000 hematias, para evitar os erros de distribuição e somam-se as plaquetas encontradas.

Exemplo:	250	hematias	15 pl	aquetas
77.5	250	"	18	*,,
100 00	250	. ,,	13	"
47.5	250	,,,	17	"
	1.000		63	"

Normalmente o numero de plaquetas encontrados é de 50 a 60 por 1000 hematias.

Para se obter o numero absoluto de plaquetas por milimetro cubico de sangue é suficiente multiplicar o numero de plaquetas encontrado em mil hematias pelo numero de hematias obtidas pelos processos comuns.

Exemplo: Em 1.000 hematias encontram-se 63

plaquetas e pelos processos comuns obtiveram-se ... 5.500.000 hematias por mm³.

1000:63: 5.000.000:X

$$X = \frac{63 \quad 5.500.000}{1.000} = 330.000 \text{ por mm}^3 \text{ de sangue.}$$

#### CAPITULO VII

## **OBSERVAÇÕES**

No inicio de nosso trabalho, afim de fixar a tecnica que nos apresentasse maior vantagem, experimentámos varios metodos. Assim, numa serie de oito individuos, começámos as contagens praticando simultaneamente numerações com diversos metodos, especialmente com os de Aynaud, Goidsenhoven, Barbieri e Fonio.

Das nossas observações chegamos á conclusão de que todas equivalem, quando executadas convenientemente, como poderemos verificar pelas cifras abaixo, media das contagens que praticámos:

Aynaud	235.200	plaq.	p.	$\mathrm{mm^3}$
Goidsenhoven	301.718	"	n	,,
Barbieri	244.753	,,	"	"
Fonio	265.680	,,	**	**

Não sendo o nosso objetivo fazer estudo comparativo entre as já numerosas tecnicas conhecidas para a contagem das plaquetas, mas sómente estudar as plaquetas nos varios estados fisiologicos, procurámos nos fixar em determinada tecnica. E a que nos pareceu mais vantajosa foi a de Fonio, aliás tambem entre nós, aconselhada pelo eminente Professor Pereira Filho.

É suficiente lançarmos o ohlar para o metodo de Aynaud, para verificarmos que a sua tecnica não é pratica para as necessidades correntes, apesar de ser uma das mais precisas, na opinião de hematologistas notaveis.

Os metodos de Goidsenhoven e Barbieri são de tecnica muito simples porém as plaquetas, com frequencia, se aglutinam. É preciso agir com muita rapidez para que os hematoblastos não se aglomerem. Na tecnica de Goidsenhoven, a uréa tem por fim destruir as hematias, porém, nem sempre tal sucede, como tivemos ocasião de observar, sempre que colhiamos o sangue na pipeta para globulos brancos, como aconselha o autor. Só obtivemos resultados, fazendo a diluição a 1 por 100, isto é, usando a pipeta para globulos vermelhos. Em palestra, os distintos colegas, Professor Walter Castilhos e Dr. Couto Barcellos, informaram que tambem tiveram ocasião de observar algumas vezes tal fato. O professor Walter, atribui tais resultados a provavel impureza da uréa. No entanto a uréa que utilizámos era procedente da celebre fabrica de produtos quimicos "Merck" "pro analise".

Em vista dos fatos acima expostos, continuámos nossos ensaios com o metodo de Fonio, observando rigorosamente a tecnica aconselhada pelo autor. Esta é relativamente facil, quando executada com precisão e rapidez. O ponto capital da tecnica de Fonio está em proceder a uma distensão uniforme, não muito espessa, em laminas bem desengorduradas, conforme já acentuamos ao descrever a referida tecnica. Algumas vezes, para tornar a distensão do sangue mais uniforme, utilizámos-nos do aparelho de Schiller fabricados pela casa Zeiss. Seu uso, apesar de não imprescindivel, é realmente aconselhavel, pois permite com facilidade a obtenção de esfregaços perfeitos.

Praticámos muitas contagens de plaquetas em 51 pacientes. Em varios contámos as plaquetas em jejum e durante o periodo digestivo, afim de verificarmos as possiveis variações durante este estado fisiologico.

Contagens tambem foram feitas, em varios pacientes, durante a menstruação e no periodo intermenstrual. Fizemos em gestantes higidas, do ambulatorio da Maternidade a contagem de plaquetas.

Nos quadros abaixo, resumiremos os resultados de nossas observações pessoais.

## QUADRO I

## NUMERO DE PLAQUETAS EM JEJUM E DURANTE O PERIODO DIGESTIVO

	Observações	Em jejum	Periodo digestivo
J. M. F.		300.700	438.480
J. C.		244.080	262.080
V. S.		215.600	331.142
В. В.		262.575	277.920
A. B. C.		276.858	319.335
F. B.		272.960	311.040
	MEDIA	262.125	323.332

Nossas observações evidenciam, portanto, leve plaquetotse digestiva, de acordo com os resultados obtidos por Ed. Benhamou e A. Nonchy e alguns outros observadores que estudaram o assunto em fóco. Confirma-se assim a necessidade de se praticar a numeração das plaquetas estando o paciente em jejum.

## QUADRO II

# ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O NUMERO DE PLAQUETAS DURANTE A MENSTRUAÇÃO E NO PERIODO INTER-MENSTRUAL

2	Observações	Durante a menstruação	No periodo intermens- trual	
A. B. V. C.	— 26 anos — casada	353.720	300.950	
O. G. B.	— 24 " — solteira	360.000	220.491	
A. B.	— 28 " — " ····	288,991	265.913	
S. M.	— 36 " — casada	345.391	298.485	
м. в.	— 23 " — solteira	212.058	168.228	
C. B.	— 27	289.900	151.980	
P. M.	— 28 " — viuva	155.540	234.780	
A. A.	_ 32 " _ "	233.060	213.979	
V. C. B.	— 18 " — solteira	333.268	260.550	
M. L. O.	— 20 " — " ····	302.493	292.880	
L. V. C. E.	— 30 ' — casada	315.022	308.580	
	MEDIA	289.949	246.983	

O quadro acima revela a existencia de leve aumento do numero de plaquetas durante a menstruação.

Houve apenas uma exceção (obs. P. M.). Nas demais, a plaquetose si bem que pouco acentuada, foi

constante. Concordam assim nossos resultados comos obtidos por Hirsch e Hartmann, os quais, usando a tecnica de Kristensen, verificaram durante o periodo menstrual, elevação do numero das plaquetas, entre 20 a 80 %, atingindo seu maximo no fim do referido periodo.

Releva mencionar, contudo que Pfeiffer, Holf, Henning assinalam, pelo contrario redução bem nitida no numero de plaquetas durante a menstruação, podendo alcançar cifrar indo até <sup>1</sup>/<sub>3</sub> do normal.

# QUADRO III NUMERO DE PLAQUETAS NAS GESTANTES

	Observações						
A. P. R	· -	29	,,	— mixta — 7.° mês	281.716		
C. V.		36	22	- branca - ultima semana	244.616		
D, S. G	. —	27	**	— mixta — 7 meses	260.760		
N. A.	_	30	"	— branca — ultima semana	179.197		
J. C.		21	"	— mixta — 2 meses	318.364		
S. F.		39	,,	— mixta — 5 meses	255.229		
A. S.		26	**	— branca — 5 meses	227.156		
D. S.	_	29	22	— mixta — 6 meses	285.186		
J. P.	-	35	"	— branca — 4 meses	251.208		
		ME	DIA		255.936		

A media dos resultados obtidos nas contagens que praticámos em gestantes, corresponde assim ao numero normal de plaquetas observado nas mulheres fóra do periodo de gestação. Mau grado afirmativa de alguns autores (Klopstock e Kovatrsky), não encontrámos a existencia de plaquetose nas mulheres gravidas.

## QUADRO IV

## ESTUDO COMPARATIVO DO NUMERO DE PLAQUETAS SEGUNDO A IDADE

1 mês a 1	ano	1 ano a 5 anos					
Heron R. 11 meses	487.987	C. T. S.	3 anos	253.920			
Nelsinda L. 9 m.	538.272	M. M.	2½ anos	340.264			
T. 3 meses	344.126	S. C.	31/2 "	280.041			
C. S. 7 meses	301.224	T. C.	5 "	296.216			
D. P. 18 meses	409.330						
MEDIA	416.187	MED	)IA	292.610			
6 a 10 a	nos		10 a 20 a	nos			
S. C 10 anos	245.072	R. B	19 anos	259.680			
[[[[ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [ [	245.072 221.940	R. B V. B		259.680 260.550			
B. L 8 anos			18 "				
B. L 8 anos	221.940	V. B	18 "	260.550			
S. C 10 anos B. L 8 anos J. A 8 anos	221.940	V. B M. O	18 "	260.550 292.880			

#### ADULTOS

J. C	25	anos	287.280	M. B 22	anos	168.228
J. F	37	,,	438.480	J. C 38	,,,	260.496
P. C	63	"	313.600	V. S 26	"	331.142
P. M	28	"	234.780	В. В 35		277.920
N. B	58	,,	142.330	A. V 26	. "	300.950
O. B	24	"	220.491	A. A 32	"	213.979
E. B	22	,,	140.120	S. M 36	"	298.485
A. C	24	,,	298.080	A. B 28	"	265.913
М. М	27	**	313.300	A. C 46	"	319.335
A. M	64	"	281.698	I. L 70	. "	283.910
F. G	50	,,	288.140	L. E 30	"	308.580
C. B	27	,,	151.980	F. B 21	. "	311.040
				A. C 28	"	285.678

MEDIA ..... 269.437

Questão das mais debatidas por certo, é a que se relaciona com as variações do numero das plaquetas segundo as idades. De modo geral, admite-se a existencia de plaquetose mais ou menos acentuada durante o primeiro ano de vida. Em trabalho recente, entretanto Benhamou e Nonchy chegaram ás seguintes conclusões:

- 1.º No recem-nascido a termo, e antes da primeira alimentação, o numero de plaquetas era vizinha das observadas no adulto. Em uma serie de 4-observações, obtiveram a media de 348.500 plaquetas.
- 2.º No lactente, cuja idade variava de alguns dias a 2 anos, com alimentação natural ou nutrido artificialmente, as cifras de plaquetas sanguineas oscilaram de 300.000 a 400.000. Assim, em 4 observações, a media obtida foi de 346.080.

3.° — Em crianças, de idade compreendida entre 2 e 9 anos, as cifras encontradas aproximaram-se sensivelmente das que se observam nos adultos.

Em 7 observações, a média conseguida foi de ... 362.714.

Opitz assinala os seguintes limites normaes nas diversas idades:

As nossa observações, entretanto, revelaram acentuada plaquetose nas crianças de 1 mês a 1 ano de idade (media de 416.187). As cifras obtidas nas demais idades equiparam-se ás medias dos resultados das contagens no adulto (media 269.437).

## QUADRO V

## NUMERO DOS HEMATOBLASTOS SEGUNDO O SEXO

	HOME	M				MU	LHER	
J. A.		256.932	s. 0	J.		245.072	С. В.	 151.980
R. B.		259.680	B. I	4.		221.940	М. В.	 168.223
P. B.		270.810	V. 1	В.		260.550	A. V.	 300.950
A. V.		246.500	M. (	0.		292.880	A. A.	 213.979
J. C.		287.280	P. 1	M.		234.780	S. M.	 298.485
J. F.		438.480	N. 1	В.		142.330	A. B.	 265.913
P. C.		313.600	0. 1	3.		220.491	I. L.	 283.910
A. C.		298.080	E. 1	3.		140.120	L. E.	 308.580
J. C.		260.496	M. 1	M.		313.300	A. C.	 285.678
V. S.		331.142	A. 1	M.		281.698	T. C.	 296.216
В. В.		277.920	F. (	ł.		288.140	S. C.	 280.041
A. C.		319.335				100001040000000000000000000000000000000	1000	
F. B.		311.040						
A. S.		253.920					- 12	
М. М.		340.264						
MEDI	Α	297.698			MEDIA			 249.784

Segundo nossas observações existe pois maior numero de plaquetas no homem do que na mulher, o que alias está de acordo com os resultados obtidos, entre outros, por Flössner.

### CONCLUSÕES

T

Apesar de já observado por varios antigos anatomista, deve-se a Hayem (1877) o primeiro estudo sistematico e pormenorizado do hematoblasto o 3.º elemento do sangue.

H

No sangue circulante, os hematoblastos seguem, como as hematias, o meio da corrente sanguinea. Apresentam forma variavel, mais frequentemente ovoide.

Em gôta pendente mostram-se como pequenos bastonetes, fortemente refringentes, do comprimento de 2 a 3 micros.

Coradas com solução de Giemsa, ou com o metodo panoptico de Pappenheim, as plaquetas, sobre preparados por esfregaço bem feito, aparecem com a forma mais ou menos redonda e constituidas de duas partes: uma homogenea quasi descorada ou levemente azulada — o hialomero, — outra granulosa corada em vermelho-violete — o cromomero.

Empregando-se somente a solução de Giemsa, é conveniente alcalinizar levemente a agua distilada. A coloração torna-se mais nitida.

#### III

Numerosas são as teorias existentes sobre a genese das plaquetas. A maioria dos hematologistas modernos inclinam-se a aceitar a teoria de Wright, que atribui a origem dos hematoblastos aos megacariocitos.

Multiplas são as funções atribuidas aos hematoblastos: inflencia sobre a coagulação sanguinea e retração do coagulo, função antixenica, entre outras.

#### IV

O maior obstaculo á contagem exata dos hematoblastos, decorre da grande vulnerabilidade e tendencia á aglutinação que esses elementos apresentam quando fóra dos vasos sanguineos.

Os metodos de contagem dos hematoblastos dividem-se em diretos e indiretos.

Dos primeiros, os mais praticos parecem-nos os de Barbieri e Goidsenhoven.

Quanto aos processos indiretos, o de Aynaud evita seguramente a possibilidade de aglutinação das plaquetas e consequente erro de contagem. Apresenta, porem, varias dificuldades de ordem pratica.

Depois de varios ensaios com diversos metodos, o que mereceu nossa preferencia foi o de Fonio, processo indireto por distenção sobre lamina. De tecnica relativamente simples, reduz ao minimo as probabilidades de aglutinação das plaquetas, quando executado com rigor.

O conhecimento do numero de plaquetas é, sem duvida, o problema que mais interessa á pratica clinica, pelo subsdio que tal pesquisa póde trazer á elucidação do diagnostico de algumas entidades morbidas.

Apesar dos resultados discordantes, não raro assinalados, a maioria dos autores referem existir habitualmente plaquetose, isto é, aumento dos hematoblastos no decurso das doenças infecciosas, na clorose, no periodo de reparação das anemias agudas ou cronicas, na infecção puerperal, na apendicite e supurações em geral.

A plaquetopenia, ou diminuição do numero dos hematoblastos, encontra-se sobretudo na anemia perniciosa e nas leucemias cronicas e agudas.

#### VI

Em grande numero de contagens de hematoblastos praticadas com o metodo de Fonio em 51 individuos em condições higidas, encontramos como media geral: 269.000 plaquetas por mm<sup>3</sup> (individuos de 1 a 70 anos).

As crianças de 0 a 1 ano apresentam o numero medio de 416.000 plaquetas por mm³. Mas outras idades não existe diferença apreciavel em relação ao numero encontrado no adulto.

Durante a gestação, não se observa modificação no numero dos hematoblastos (media de 255.870 p. mm³ em nove das nossas observações). Nas mulheres nota-se leve plaquetose durante a menstruação (289.949 por mm³). Nos homens, em regra, é

maior o numero de hematoblastos do que nas mulheres (aproximadamente diferença de 48.000 elementos).

Durante o periodo digestivo existe sensivel plaquetose (media de 323.332). Daí a necessidade de se praticar as contagens dos hematoblastos estando sempre o paciente em jejum.

#### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 Asúa, F. J. Elementos de Hematologia 1.º ed. pag. 40 — 1932.
- 2 Aynaud in Traité du sang Gilbert e Weinberg Vol. 1.º — pags. 410, 439 — 1913.
- 3 Bard Précis de exames de Laboratoire 3.ª ed. pag. 406 — 1918.
- 4 Benhamou e Nonchy Les plaquettes sanguines chez le nouveau-né, le nourrisson et le jeune enfent C. R. S. Bilogie T. CVIII N.º 15 18 Mai 1931 pags. 171-172.
- 5 Benhamou Léxploration Functionelle de la Rate pags. 51 e 52 — 1933.
- 6 Beylot Bandrimont Manuel Theorique et Pratique d'Histologie — 3.° ed. — pag. 113 — 1932.
- 7 Berdal Histologia Humana trad. hesp. 3.° ed. —pag. 227 — 1927.
- 8 Bezançon Labbé Traité d'Hematologie pags. 711 a 723 — 1904.
- 9 Bouin Éléments d'Histologie V. 1.° pags. 233 a 237 1929.
- 10 Branca Précis d'Histologie 5.° ed. pags. 168-173 1921.
- 11 Cajal, R. Tello Muñoz Elementos de Histologia normal e tecnica micrografica — 10.º ed. — pags. 245-259-262 — 1931.
- 12 Carazzi Levi Tecnica Microscopica 3.ª ed. pag. 322 — 1916.
- 13 Champy Précis d'Histologie 1.° V. pags. 205-208 1928.
- 14 Cumings, J. A methode for the enumeration of blood platelets pag. 923 a 927 The Lancet June 10, 1933.
- 15 Felippo Jorio L'urine e il sangue pag. 439 1930.

- 16 Ferrata Le Emopatie 1.° V. parte 1.° pags. 120 a 143 199 a 211 1933.
- 17 Ferrata Le Emopatie 1.° V. parte 2.ª pags. 352, 673 1933.
- 18 Galarce, B. Apuntes de Quimica Biologica 2.ª ed. pag. 176 192.
- 19 Gram, H. C. On the platelet count and bleeding time in diseases of the blodd — Archives of Internal Medicine — March, 1920, N.º 3 pga. 325.
- 20 Hayem, G. L'Hematoblaste 1923.
- 21 Höber Fisiologia Humana trad. hesp. pag. 203 1928.
- 22 Jolly Traité Technique d'Hematologie 1.° V. pag. 381 1923.
- 23 Klopstock-Kowarsky Manuele dei Metodi rizerca clinici, chimici microspici e batteriologici — pags. 380-381 —2.ª ed. — 1931.
- 24 Langeron Précis de Microscopie 4.º ed. pag. 832 1925.
- 25 Langley, J. M. Practical Histology 3.<sup>a</sup> ed. pag. 19 1920.
- 26 Leake e Emmet Liquido de diluicion de las plaquetas The J. A. M. A. E. E. — 15 abril 1925 — pag. 532.
- 27 Leitão da Cunha Tecnica anatomo-patologica pag. 276 1917.
- 28 Levi, G. Tratado de Histologia trad. hesp. pag. 841, 872 e 877 — 1931.
- 29 Mario Andréa Tecnica Histologica pag. 292 1926.
- 30 Naegeli, 0. Enfermidades de la sangre 2.ª ed. hesp. pags. 361, 375 e 872 1912.
- 31 Opitz Composição do sangue nas diversas idades Brasil Medico, 17 Março 1934 — Pag. 188.
- 32 Pagniez In Traité de Patologie Medicale Serjent, Babonneix — Pag. 29 e 33 — 1922. — Vol. X.
- 33 Piney, A. Recientes Adquisiciones en Hematologia trad. hesp. — pags. 20, 32, 83, 187, 194 e 220 — 1928.
- 34 Pittaluga, G. Enfermedades de la sagre e Hematologia Clinica pags. 41, 89 e 116 1922.
- 35 Policard Préis d'Histologie Physiologique 2.ª ed. pag. 231 — 1928.
- 36 Rieux Hematologie Clinique pag. 44, 153 a 339 1924.
- 37 Romeis Guia Formulario de Tecnica Histologica trad. hesp. pag. 326 — 1928.

- 38 Rosenow Enfermidades de la Sangre 2.ª ed. da trad. hesp. — pags. 19, 61 a 63 — 1931.
- 39 Scharpey-Shafer The Essentials of Histology 12.<sup>a</sup> ed. 45 1929.
- 40 Salamanca, F. E. Compendio de Hematologia 2.ª ed. pags. 21 a 23, 40 1931..
- 41 Schilling El quadro Hematico trad. hesp. 2.ª ed. pags. 10, 68, 69, 78 e 234 — 1934.
- 42 Stöhr, F. Tratado de Histologia. trad. hesp. da 19.ª ed. alemã pags. 185, 219 1924.
- 43 Szymonowicz Trattato de Istologia e Amatonia Microscocopica — trad. ital. 2.ª ed. pags. 147 a 148 — 1924.
- 44 Tourneux Précis d'Histologie Humaine 2.ª ed. pag. 220 1911.
- 45 Varela, M. Lecciones de Hematologia pags. 75, 103 1929.
- 46 Vialleton Technique Histologique et Embryologique 2.ª ed. pags. 296, 297 1909.
- 47 Warsamy L'Examen du Sang. pag. 104 1928.
- 48 Heraldo Maciel Noções clinicas de Laboratorio 1." Vol. 2." ed. pag. 103 1934.
- 49 Ferrata Le Emopatie 2.º Vol. parte 1.ª 2.ª ed. pag. 86 1934.

----

Aceita pelo C. T. A.

Em 10/9/1934.

O Secretário: Dr. Felisberto Soares Rath.