

CORA DE MOURA PEDREIRA

Assistente da Faculdade de Filosofia da
Universidade da Bahia

Assistente honorária da Faculdade de Me-
dicina da Universidade da Bahia

NOTAS BIOLÓGICAS

(A coloração supravital do sangue de indivíduos normais,
aplicada à pesquisa de reticulócitos).

Tese para concorrer à docência livre
da cadeira de Biologia da Faculdade
de Filosofia da Universidade da Bahia.

BAHIA — 1950



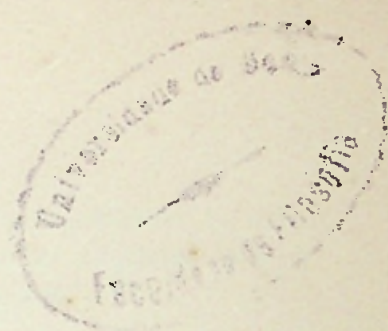
UNIVERSIDADE DA BAHIA
FACULDADE DE FILOSOFIA
BIBLIOTECA
N.º do Tombo 35217

NOTAS BIOLÓGICAS

CORA DE MOURA PEDREIRA

Assistente da Faculdade de Filosofia da
Universidade da Bahia

Assistente honorária da Faculdade de Me-
dicina da Universidade da Bahia



NOTAS BIOLÓGICAS

(A coloração supravital do sangue de indivíduos normais,
aplicada à pesquisa de reticulócitos).



Tese para concorrer à docência livre
da cadeira de Biologia da Faculdade
de Filosofia da Universidade da Bahia.

BAHIA — 1950

Agradecimento

“... no curso das efemérides da vida, sobredestacam-se as amizades com a feição da eternidade”.

Aos meus amigos que me prestaram o estímulo decisivo de sua palavra e a decidida vigilância de seu cuidado e, mais, a constância de seu pensamento, na mais significativa de suas expressões !

À Reitoria e à Direção da Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia e aos Professores Octávio Torres, Mário Andréa, Carlos Geraldo de Oliveira, amigos e mestres quando me franqueram os seus laboratórios para a execução dos trabalhos práticos da Cadeira de Biologia da Faculdade de Filosofia, ou me facultaram a utilização de seu material técnico e de sua bibliografia.

Palavras explicativas

A escolha de um assunto para TESE e as dificuldades técnicas, no caminho de sua realização, constituem os sobressaltos de quem se inicia na seara da produção didática.

Os múltiplos obstáculos que tomam o passo e entram a marcha dos trabalhos dessa natureza, tantas vezes se conjugam em verdadeira mutuação de impossíveis, que só e tão só os reclamos e os apelos dos anseios íntimos e das decisões definitivas logram superar.

Sabem-no os que lavraram igual terreno e feriram-se nos acúleos das mesmas incertezas e do mesmo cansaço. Neste exemplo, buscam inspiração e colhem estímulos os noviços, para vencer idênticos e benditos anelos.

O tempo decorrido entre o ponto inicial da resolução desse pequeno trabalho e aquele de seu termo, quase se pode medir pela cronometragem dos dias e nisto reside, certamente, a ausência dos ornatos que dão valor e brilho às obras científicas.

No mundo da Biologia, faiscavam as estrêlas dos mais sedutores assuntos. Tantas a requerer uma contribuição, um estudo, u'a meditação... Quantos a exigir o trato de uma análise, o desenvolvimento de uma pesquisa... A trilha promissora da Genética. O inesgotável domínio mesmo da Citologia, onde se ergue a cidadela que comanda o mundo vivo. A Embriologia com os seus mistérios e os seus encantos, capítulos, todos, inacabados, sendas ainda de bonançosas messes. Teorias novas, velhas fórmulas rejuvenescidas, incógnitas irredutíveis, esfinges falando a eterna linguagem do "DECIFRA-ME OU EU TE DEVORO", tudo a desafiar a argúcia e a habilidade do homem, essa personagem "DESCONHECIDA" cuja maior sugestão e o melhor convite esteve inscrito no pórtico dos templos da sabedoria helênica e perdura na evidência dos mandamentos do presente: "CONHECE-TE A TI MESMO".

Urgia, porém, o tempo. Escasseava a bibliografia, faltava o material, agravados pelo demérito de quem os rebuscava e os perseguia, no afã de realizar a tarefa que as circunstâncias lhe apontavam, imperativas.

*Sabem-no, ainda aqui, os que um dia se iniciaram e revis-
tam-se de compreensão e de tolerância para a ignorância e a
inexperiência dos noviços, auscultando-lhes, apenas, as vozes das
louváveis e justas aspirações...*

Bahia, 28 de setembro de 1950.



Da Corolação Supravital

- I — generalidades
- II — escôrço histórico
- III — divulgação de técnicas
- IV — descrição do processo empregado

I

A Biologia, trabalhando no campo de reconhecimento dos fenômenos da vida, vai semeando-o de conquistas cujo escopo dominante é a observação dos fatos, mercê de processos cada vez mais próximos da realidade vital.

Os métodos biológicos forjam e utilizam recursos que possam fazer a experimentação laboratorial seguir parilha com o fato vivo, sem modificar-lhe o curso, as leis e o verdadeiro sentido. Caminham, assim, para a análise detida e acurada do ser vivo, no exercício pleno de seu dinamismo e na preservação completa de sua estrutura, acompanhando o mecanismo de seus processos, registrando as atividades de suas reações físico-químicas, anotando os têrnos das assimilações e desassimilações expressas na transformação de suas energias, para a escrita fiel e a síntese correta das interpretações morfo-fisiológicas.

No particular da citologia, as técnicas de observação da complexa estrutura celular e de seu difícil metabolismo, na plenitude do estado vivo e da integridade funcional, revelam roteiros não de todo devassados para onde marcham os experimentalistas, através das gerações de pesquisadores, sempre de âncoras projetadas para um futuro de realizações, em proveito do patrimônio das ciências biológicas.

A célula resume tôda a história da biologia. Nas páginas semi transfolheadas de sua morfologia ou no perfil meio bosquejado de suas atividades, reside o tesouro dos segredos vitais que a curiosidade do investigador cobiça desvendar, arquitetando métodos, esculpindo processos, cinzelando técnicas, esbatendo arestas, no aperfeiçoamento incansável de inventos que não conduziram toda-

via a êste falado mundo sub-microscópico onde as objectivas não passaram ainda os seus faróis, iluminando as gemas das riquezas que a célula esconde em seu recesso.

Ensaio vários trazem um acervo de contribuições. Métodos de exame a fresco. Processos de fixação. Técnicas de coloração vital foram sucessivamente sofrendo a crítica e o esmero. Êste não revelava tudo. Aquêlê fal-seava, possivelmente, mostrando uma fisionomia estática, coagida pelos artifícios e porisso mesmo estranha, certo ponto, à verdade biológica. Aqueloutro carecia reunir qualidades de ambos para resultar utilidades, sem que, advirta-se de logo, nenhum ensaio invalide o outro ou mesmo definitivamente o supere na tarefa especializada de cada um.

Seguiram-se experiências. Do carinhoso trato na técnica da coloração vital e suas variantes, da cultura de tecidos — método sôbre o qual Carrel prometia construir tôda uma biologia —, às agressões armadas que executam a vivisseccção das células nos tecidos, curiosa cirurgia de laboratório, à microinjecção de líquidos e corantes no corpo quase imaterial, substâncias destinadas ao relato de suas mais preciosas intimidades, à micrografia, em celuloide, dos passos mágicos de suas atividades, enfim, transpondo barreiras, escalando muralhas, surpreendendo fenômenos, até que um dia possam os mais entranhados enigmas biológicos aflorar e vir a lume numa contribuição útil de ensinamentos para o homem que os esquadrinha pressuroso em benefício da humanidade que os espera paciente.

Quem sabe, se no curso da vida do homem, afinal êle mesmo uma caudal de células que passam ou melhor "um remanso passageiro na corrente contínua e sem fim de protoplasma em forma de células, que se desvanece sem deixar rastros, enquanto segue adiante o fluxo da

vida..." (Wilson) * não venha a solução dessas incógnitas apontar outras diretrizes ao determinismo genético que traz inscritos no coração da célula geratriz a profecia geral dos destinos...?

II

Descobertos os glóbulos do sangue, os vermelhos por Swammerdan (1658) e os brancos por Spallanzani (1768) * permearam-se lustros e décadas entre o registro dessa observação e a compreensão da fisiologia das células do sangue.

Variadas técnicas foram introduzidas ao estudo do sangue. Investigações de Malpighi, locubrações de Leuwenhoeck, de Ch-Robin de Hewson, de Ranvier e Cohnheim, entre os pioneiros, alicerçavam o edifício inacabado da bio-fisiologia do sangue, "capítulo de surpresas" "sítio das funções más complejas, más variadas, más polimorfias" (Garreton) *, onde trabalham milhares de pesquisadores, construindo uma das mais ricas e prósperas especializações biológicas.

A coloração do protoplasma vivo parece haver sido primeiro observada pelos chineses em animais alimentados por uma planta tintorial. A gênese da aplicação científica remonta ao século XVI onde encontramos o nome de Mizaud e séculos depois, Belchior (1736) e Du Hamel (Branca) * em pesquisas sôbre ossificação.

As células do sangue foram das primeiras coradas vitalmente, estabelecendo-se definitivo o conceito, as normas e as utilidades do método de coloração, posto que até o presente, haja quem o considere, ainda, em fase experimental (Hall) *

(*) Bibliografia

Autores confundem os dois métodos chamados de *coloração vital e supravital*, usando indiferentes a mesma terminologia. Definem, outros, fronteiras ao emprego dos dois termos.

Seria a primeira designação própria do método de introduzir substâncias corantes diretamente no ser vivo. Reservada a segunda ao processo de coloração de órgãos, tecidos, células, dissociados, separados do todo vivo, mantendo, todavia, a vitalidade ao tempo da observação, sem interromper a marcha metabólica da célula.

Severa crítica é feita à chamada *coloração vital* das células do sangue pelo fato de, em realidade, não se tratar de *célula viva* e sim de preparação que não foi previamente fixada. Acodem as justificativas na asseveração de sobrevida da célula, enquanto vigentes as energias protoplásmicas, traduzidas nos fenômenos de irritabilidade. Surgem explicativas conciliatórias admitindo que a coloração se faça "depois da morte somática, porém antes da morte molecular".

O método da *coloração supravital* deverá ser definitivamente conceituado como sendo, na palavra de Gradwohl *, um meio de ação sôbre as células :

"after their removal from the living body, but before all cellular activity stops".

Assim é aplicado ao estudo do sangue, obedecendo às condições básicas estipuladas para a *coloração vital* das células e utilizando os mesmos corantes chamados *vitais*.

Este processo fortificou arraiais nos domínios da hematologia. Os elementos do sangue, em suas componentes estruturais, são investigados largamente, pondo-se em evidência as mais delicadas figuras morfológicas, es-

(*) Bibliografia

tabelecendo-se um critério de distinção entre as duas séries vermelha e branca e abrindo-se largas aplicações ao estudo da patologia, pelo reconhecimento e interpretação das anomalias surgidas no perfil morfo-fisiológico dos glóbulos ou pela presença de elementos anormais, denunciadores de perturbações na harmonia dos componentes do sangue. Na série vermelha, o estudo da morfologia sobredestacada pelos contrastes das tintas e mesmo do equilíbrio fisiológico, traduzido por tantos sinais: a distribuição e eletividade dos corantes, o caráter acidófilo ou basófilo, a policromasia ou acromatofilia são sugestões que o biólogo acata na difinição da normalidade. Na série branca: o núcleo, os grânulos, as mitocôndrias, as reações dos corantes, de certo modo as etapas da maturação, permitem imagens microscópicas caracterizadas pelas côres inconfundíveis dos quadros que apresentam. Não é, desse modo, um método ocioso o da *coloração supravital*, nem figura na galeria dos processos como curiosidade de experimentação.

Distingue-se da observação natural a fresco, pela riqueza de filigranas que entremostra na estruturação “maravilhosamente arquitetada do arcabouço das células” e avanta-se, na investigação biológica, sobre a fixação e coloração dos processos não vitais, na prestância e na valia dos ensinamentos sobre motilidade, fagocitose e propriedades outras que restam asseguradas.

Na pesquisa de *reticulócitos* entre os glóbulos vermelhos do sangue é empregado, desde o fim do século transcurso, quando nos anunciam de primeira mão, Pappenheim e Israel (1896), seguidos de perto por Cesaris — Demel (1907), Ferrata (1907) e tantos outros entre Widal — Abrami — Brulé, Poggi, Chauffard, Fiessinger, Cowdry, Simpson, Sabin, Cunningham e tantos e tantos ensaistas de variedades técnicas.

Usadas tintas diversas. Corantes ácidos e básicos, naturais e artificiais, no encaço de duas qualidades :

a) atoxicidade ou nímio prejuizo para a vida da célula.

b) suficiente capacidade de tintura.

A concentração das soluções, as reações do pH, a estabilidade dos corantes foram indagadas até que se elegessem, dentre as substâncias tintoriais manipuladas na técnica cito-histológica, aquelas melhormente classificadas. Chegou-se, então, a alistar um grupo de corantes chamados *vitalis* e largamente ensaiados. Relacionamos alguns :

vermelho neutro
azul de cresil brilhante
azul de metileno
azur I e II
azul de toluidina
azul de Nil
azul tripânico
verde malaquita
verde de metila
verde Janus
pardo de Bismarck
violeta de Hoffmann
violeta de genciana
pironina etc.

O vermelho neutro foi o primeiro usado por Pappenheim e o azul de cresil veio trazido por Cesaris-Demel.

III

Tantas são as técnicas usadas, quantos talvez os experimentalistas que se ocuparam da *coloração supravital* — Pequenas modificações, variação no uso dos corantes básicos, no preparo das lâminas, minúcias, filigranas, a cada passo descritas, com o fim de facilitar ou aperfeiçoar o método, cobrando-lhe do uso maior soma de utilidade.

Desafiando a longa meada dos processos *supravitalis* no sangue, convoquemos Pappenheim, a abrir a fileira dos ensaios, tocando a tecla inicial na escala sugestiva do método para citar, exclusivamente, aqueles indicados na identificação especializada da *substância grânulo-filamentosa*, característica do *reticulócito*.

1) Pappenheim e Israel : —

(corante: vermelho neutro)

Ajuntar ao sangue colhido uma gota de solução alcoólica de vermelho neutro, distendendo, com um pequeno bastão de vidro, a mistura sôbre a superfície de uma lâmina, fazendo-a passar por sôbre uma chama, a fim de facilitar a evaporação. Resta, assim, sôbre a superfície da lâmina, uma sutil camada de corante. Examinar ao microscópio.

2) Ferrata e Boselli : —

(corante: azul de metileno e tionina)

Solução alcoólica de azul de metileno e tionina a 0.5 %. Tomar de uma lâmina e passeá-la sôbre uma chama a fim de excluir qualquer traço de umidade.

Deixar cair sôbre a superfície uma gota da solução corante, por intermédio de uma pipeta de fino calibre. Distende-se espontânea e de modo uniforme, formando uma camada muito delicada, depois de evaporado o alcool. Com uma lamínula recolher uma gota de sangue e fazer espalhar sobre a lâmina corada.

Ao microscópio aparecem, diferenciadas pela coloração, a *substância grânulo-filamentosa* corada em violeta pela tionina e as granulações basófilas que se tingem de azul.

3) Cesaris — Demel :

(corante: azul de cresil brilhante)

Preparar a lâmina previamente com o sangue e cobri-la de solução corante.

Recomenda não prolongar a observação do preparado a fim de que, pelo dessecamento, fenômenos de absorção não venham favorecer modificações no protoplasma celular. Interromper o estudo se os leucócitos apresentarem coloração nuclear.

4) Cowdry : —

(corante : verde Janus)

Misturar, em lâmina limpa, uma pequena gota de sangue com uma pequena gota de solução de verde Janus (1:10,000) em 0.85 % de solução salina.

Deixar espalhar, cobrir com lamínula e lutar com parafina.

Examinar dentro de 5 a 10 minutos.

As *granulações e filamentos* são de um verde azul profundo.

5) Sabin, Cunningham, Simpson, Tompkins e Masugi, utilizam, com pequenas variantes, as seguintes combinações de corantes :

1 — verde Janus (sol. alcoólica)

2 — vermelho neutro (sol. alcoólica).

A trama dos *reticulócitos* é corada em vermelho. Os eritrócitos não reagem em geral, a este corante. Este método, é preferentemente aplicado ao estudo dos leucócitos.

6) Sabrazés : —

(corante: azul de metileno)

Corar o sangue espalhado, não fixado, com uma solução aquosa hipotónica de azul de metileno

$\left(\frac{1}{500} \right)$.

7) Todd e Sanford, aconselham : —

(corante: azul de cresil)

1.º — Solução saturada de azul de cresil brilhante, preparada num pequeno tubo de Wassermann..

Colocar uma gota de sangue sobre lâmina e do lado desta outra gota do corante.

Misturar com bastonete de vidro, espalhar pelo método usual e corar pelo corante de Wright.

2.º — Num pequeno tubo de centrifugador colocar :

a) solução de azul de cresil brilhante a 1 % em sol.

salina a 0.85%, recém-filtrada 5 gotas

b) solução de oxalato neutro de potássio em sol.

de clorêto de sódio a 0.85 % .. 25 gotas

(Kolmer e Boener, preconizam a mesma técnica, usando em vez de sol. salina de azul de cresil, a sol. alcoólica).

c) puncionar o dedo ou a orelha deixando cair 2 ou 3 gotas de sangue dentro do corante.

Misturar suavemente e deixar em repouso 10 a 20 minutos.

d) Centrifugar ligeiramente e remover a porção sobrenadante da mistura, usando uma pipeta capilar, deixando um volume igual ao volume dos corpúsculos. Misturar êsse sedimento. Retirar uma pequena gota e fazer o espalhamento em lâmina, deixando secar ao ar.

O sedimento deve ser suficientemente concentrado para permitir uma secagem rápida e bem misturado para evitar uma distribuição desigual das *células reticuladas*, em virtude de possível diferença na sua gravidade específica.

e) Examinar ao microscópio com lente de imersão em óleo. Pode-se também corar pelo Wright.

8) Whintrobe recomenda :

(corante: azul de cresil brilhante)

Solução alcoólica de azul de cresil brilhante a 0.5 % em álcool absoluto ou a solução salina a 0.85 %, adicionada de 0.4 % de citrato de sódio.

Preparar a lâmina com o corante e inverter sobre ela uma laminula com uma gota de sangue, lacrando os bordos com vaselina ou parafina.

Também preconiza o espalhamento da preparação feita com uma gota do corante adicionado de uma gota de sangue, secar e corar por qualquer Romanowsky.

Indica ainda : "or, simplest of all" :

uma gota de sangue de mistura com uma gota de corante entre lâmina e lamínula.

A preparação úmida é lutada e examinada ao microscópio.

9) Stitt (modificação do método de Klemperer)
(corante: azur II)

Preparar uma solução estoque de azur II a 1% em alcool absoluto.

Diluir, no momento do uso : 1 cc da solução estoque em 5 cc de alcool absoluto.

Preparar as lâminas lavando com água e sabão, lavar novamente em água distilada, alcool absoluto, água distilada, secar e passar sobre chama.

Fazer uma película fina de corante, deixando secar ao ar.

Puncionar o dedo ou a orelha. Tomar uma gota e espalhar sobre a lâmina. Colocar em estufa aquecida. Examinar por um período de 20 minutos, voltando à estufa depois do exame.

10) Ch. Aubertin, aconselha :

(corante : azul de metileno no método de Sabrazés e o azul de cresil na seguinte diluição) :

solução alcoólica de azul de cresil a 5 % .

Preparar uma lâmina como usualmente se descreve. Secar e aplicar uma gota de sangue.

Misturar num tubo de hemólise 5 gotas de sangue e 5 gotas de uma solução de :

azul de cresil brilhante	1 gr
cloreto de sódio	0.8 "
água destilada	100cms2

Após 30 minutos espalhar em lâmina e secar, examinando ao microscópio a imersão.

11) Hailey, Maximow, Bloon, Hall, entre muitos, citam o azul cresil e vermelho neutro entre os *corantes vitais* preferidos para a determinação da reticulocitose.

12) Hetherigton : —

(corante : pinacianol)

Preparar uma solução estoque com 0.1% de pinacianol — em 100% de alcool.

Diluir 1:40 em 100% de alcool.

Flambar a lâmina limpa, cobrir com o pinacianol alcoólico, diluir e escoar o excesso.

Secar e colocar sobre o filme uma pequena gota de sangue, cobrindo-o com lamínula limpa.

Lutar os rebordos com parafina.

Indica, igualmente, a mistura do duplo de vermelho neutro com sol. alcoólica diluída de pinacianol.

13.) Chauffard e Fiessinger : Coloração quase vital pelo reativo de Pappenheim.

Misturar em partes iguais solução aquosa saturada de pironina e verde metila.

Fazer o espalhamento do sangue em lâmina e secar por agitação do ar.

Examinar ao cabo de alguns minutos à imersão. Os grânulos das hemátias tomam a côr vermelha da pironina.

14) Kammerer :

(corante azul de cresil brilhante)

Numa pipeta de leucócitos aspira-se, até à marca 0,5 o sangue colhido por punção digital, e até à marca 11 a solução de azul brilhante de cresil a 0.05 % em sol. salina a 0.85%.

Repouso de 30 minutos. Contar numa câmara de hematímetro: proporção entre gl. vermelhos normais (maduros) e reticulócitos (imatuross, com granulações filamentosas).

15) Holboll — modificado por Heilmeyer

(corante : azul de cresil brilhante)

Coloca-se em cápsula de parafina 0,1 cc de sangue e 0,025 da solução azul de cresil brilhante em solução fisiológica de cloreto de sódio, mantendo-se durante quinze a quarenta minutos em câmara úmida, distendendo-se, em seguida, o conteúdo sobre uma lâmina. Fazer transparente a preparação por imersão oleosa.

16) Schilling :

(corante : azul de cresil brilhante)

Estender, em lâmina, uma camada delgada de solução alcoólica de azul de cresil brilhante e deixar secar. Sobre a película do corante fazer o espalhamento de uma gota de sangue deixando

permanecer por cerca de dez minutos numa caixa de Petri forrada de papel de filtro umedecido (câmara úmida), com o propósito de retardar a dessecação.

17) Cook, Meyer, Tureen usam :

(corante: azul de cresil brilhante....

sol. salina 1%

sol. de oxalato de potássio 1%)

Seguindo o curso da técnica já descrita.

18) Kracke indica :

(corante : azul cresil brilhante)

Estender, em bom esfregaço, sobre uma lâmina limpa, algumas gotas de solução de azul cresil brilhante.

Secar ao ar.

Colocar uma pequena gota de sangue no centro de uma lâmina e invertê-la sobre a lâmina corada. Pode-se untar os bordos com vaselina.

Deixar em repouso por 10 minutos para corar completamente.

Examinar com a objectiva de imersão.

19) Janini realiza a mesma técnica com o azul de cresil brilhante misturado ao sangue. Feito o esfregaço, corar pelo Leishmann, May — Grüwald — Giemsa etc.

Da análise das técnicas conclui-se pela maior aceitação do azul de cresil brilhante, introduzido por Cesaris-Demel, entre a lista de numerosos *corantes vitais* usados na investigação biológica.

IV

Ensaaiados vários métodos dentre os acima descritos recaiu a nossa preferência sôbre o *azul de cresil brilhante*, de fácil manejo e de bons resultados.

Para a execução de boa técnica, sirvam-nos de norte quatro postulados, de cuja observância resultará o corolário do melhor êxito a que se aspira no curso da experimentação laboratorial :

- a) o carater *vital* do corante, ou seja, a eleição de tintas atóxicas para o protoplasma ou de prejuizo mínimo, capazes de garantir, por algum tempo, a sobrevivida da célula.
- b) material rigorosamente limpo.
- c) execução fiel da técnica escolhida
- d) segurança de interpretação.

Roteiro

Limpeza rigorosa das lâminas e lamínulas com solução química até que apresentem superfície polida, livre de substâncias estranhas ou manchas de gordura.

Flambar ligeiramente as lâminas, no momento do uso.

Perfeita limpeza de todo o material usado no curso da experimentação.

Preparo da solução :

azul de cresil brilhante 1 gr.
sol. salina de cloreto de sódio a 0,85 mg 99 cc

Punção da polpa digital com lancêta das do modelo de Bensaúd, deixando correr espontaneamente o sangue.

Recolher diretamente uma pequena gota sôbre uma das extremidades da lâmina. Também podemos colher uma gota de sangue com um dos bordos da laminula e deixar cair sôbre a lâmina.

Depositar ao lado da gota de sangue uma gota de solução corante, por meio de uma pipeta de diâmetro capilar.

Misturar homogeneamente, com um pequeno bastão de vidro até que a mistura apresente coloração castanho escuro (vinhoso).

Recobrir com pequena lâmina cujo pêso favoreça o espalhamento uniforme, evitando a retenção de bolhas de ar.

Lutar os rebordos com parafina.

Deixar em repouso 15 a 20 minutos para que se faça boa coloração.

Examinar ao microscópio com lente de imersão ou a sêco, observando grande aumento.

Empregamos simultaneamente, duas técnicas: a primeira usando uma das metades da lâmina, enquanto a outra era praticada na outra metade.

Preparar as lâminas da maneira descrita, fazendo-se o espalhamento da mistura: *azul cresil-sangue*, como usualmente feito nas técnicas correntes, observando uma película fina e bem distribuída.

Secar ao ar. Corar pelo Wright, colocando algumas gotas do corante sôbre a película. Em seguida, igual número de gotas de água destilada deixando permanecer 3 a 4 minutos, lavando em água corrente, sem retirada prévia da solução corante.

Secar passando a lâmina sôbre chama de álcool. Examinar ao microscópio com lente de imersão em óleo.

Identificação :

Os pequenos discos de eritrócitos, bicôncavos e arredondados, tingem-se ligeiramente de verde amarelado, entremostrando pequena área central menos corada e mais brilhante.

Sôbre o fundo verde amarelado das hemátias, sobredes-taca-se o azul escuro (deep blue) do *retículo-filamentoso*. Os *reticulócitos*, ou glóbulos portadores de *retículo filamentos* apresentam aspecto morfológico desigual, na distribuição da trama filamentosa tênue ou mais espessa, contínua ou entremeada de granulações discretas.

Contagem de reticulócitos

Realizar a contagem de 1000 a mais eritrócitos e determinar o porcentual de *reticulócitos*.

Sanford recomenda mil, indicando o número de 3000 como o melhor.

Kolmer indica 2.000 e Wintrobe aceita 1.000. Foi aplicada a fórmula citada por Kolmer :

$$\frac{\text{número de células reticuladas}}{20} = \text{por cento}$$

Para facilitar a contagem dividir o campo em quatro partes iguais ou formar com fios de cabelos colados à objectiva, 1 retângulo.

Frank e Kämmerer sugerem contar como se fôsse uma hematimetria ou leucometria.

Wintrobe manda colocar na ocular do aparelho um pedaço de papel no qual tenha sido feita perfuração de aproximadamente $\frac{1}{4}$ de polegada quadrada — ou reduzir o campo por meio da ocular redutora de Erlich.

Há discos graduados, próprios para o micrômetro.

Schulten recomenda como especialmente prático, recortar em cartão o diafragma com abertura oval, cujo diâmetro mais curto será marcado por um cabelo formando ponte (Fig. 1, pg. 41)

Nos casos de anemia fazer a contagem indispensável de glóbulos vermelhos para que se não infiram resultados falsos.

Tomamos de um cartão, recortamos um círculo, espalhamos cêra sôbre os bordos cruzando, em disposição de retângulo central, quatro fios de cabelo, adaptando ao diafragma da ocular.

Causas de êrro

Corante demasiado. Imperfeição de técnica; preparação muito espessa onde os glóbulos empilhados, amontoados, não oferecem superfície livre para um cuidadoso exame. Destruição das hemátias. Morte das células, denunciada pela coloração dos núcleos dos leucócitos que, no particular, se não devem tingir enquanto vivos. Acentuamos *no particular* porisso que biólogos apresentam experiências de *coloração vital* onde a célula viva oferece um núcleo corado. Como exemplo referem protozoários vivendo com o núcleo tinto pelo vermelho neutro e certos vegetais que oferecem o mesmo aspecto com violeta de Hoffmann ou verde malaquita (Sharp). *

Entre as causas do êrro advertimos, igualmente, a adesão de grumos aos glóbulos, mascarando o campo e dificultando a interpretação.

(*) Bibliografia

Reticulocitose

- V — discussão de conceito
- VI — cifras normais e patológicas
- VII — caracterização morfológica

Reticulócito é um *eritrócito jovem*, recém emigrado, talvez, da medula óssea, que apresenta reação basófila aos *corantes vitais*, exibindo ao microscópio uma trama feita de *substância grânulo-filamentosa* desenhada na face dos glóbulos vermelhos.

É a *hemátia-grânulo reticulada* de Sabrazés, ou o *reticulócito* de Krumbhaar.

No primeiro trato com o assunto sobrevem a discussão de terminologia, condenando uns, aceitando outros, a denominação de *reticulócito* mais consagrada pelo uso. Hans Schulten adverte de sua impropriedade com o argumento de que se não trata de uma "classe especial de células nem permite pensar em nenhuma espécie de relação com o retículoendotélio", admitindo, porém, conformismo com essa denominação entre "outras muitas, ilógicas". Não faltam vozes nesse côro, enquanto acodem os que situam o *reticulócito* na escala de maturação do eritrócito, dando-lhe individualidade morfológica e reconhecendo-lhe direito de especial designação.

Eritrócito reticulado, substância — grânulo — filamentosa das hemátias, hemátia filamentosa, reticulócito, são expressões correntes. Aceitaremos esta última, mais amplamente adotada.

Muitos dos elementos figurados das células, ao tempo de suas primitivas visualizações, restaram contestados longamente pelo argumento invariável de que se tratasse, talvez, de imperfeição de técnica, ou de modificações posteriores surgidas na estrutura do coloide protoplasmático cujos segredos permanecem ainda enleados na teia de sua físico-química não de todo explorada. Assim foi para as descrições primeiras da *substância reticulada* dos glóbu-

los da série vermelha, por meio do uso de *corantes vitais*, suscitando de logo a controvérsia de sua existência real.

Fizeram-se experiências. Corantes variados e, para muitos, continuava o reticulócito como um produto de técnica, no ror das figuras morfológicas, criadas pelo laboratório.

Não faltou quem afirmasse ser isto um elemento estranho e quem asseverasse a não preexistência de substância alguma na textura das hemátias, em cujo estrôma homogêneo jamais se sobredestacavam quaisquer indícios de *redes filamentosas* ou de *granulações* biológicas de qualquer espécie.

Entre aqueles que opinaram por esta hipótese encontramos citados os nomes de Weidenreich, Meves, Grunberg entre outros. (Champy) *

Weidenreich estudando a estrutura do glóbulo vermelho normal afirma :

“D'autres produits que l'on voudrait faire dériver du noyau n'existent pas en réalité: ils sont dus aux différentes méthodes de coloration et à d'autres procédés de préparation”. *

Insiste ainda :

“On ne peut lui découvrir aucune structure protoplasmique” . . . ces produits qui n'existent pas du tout en réalité et ne sont que des artifices”. *

Entretanto Champy, na mesma época, (1913) escreve: “Les globules rouges ont été dotés de structures les plus diverses” *

Acreditaram outros estar ligada a presença do *reticulócito*, à degeneração celular ou ainda aos processos de involução citoplasmática, representando “un residu de la substance cytoplasmatique des érythroblastes”.

(*) Bibliografia

Noutra concepção firmava-se a teoria de que restos de cromatina mal dissolvidos seriam os verdadeiros *grânulos filamentosos* (retículo) do *reticulócito*, numa fase não de todo desaparecida de maturação celular, com persistência ainda de elementos nucleares e seriam assim "*poussiére de cromatine*", tanto mais aceitáveis quanto a sua eleição pelos corantes ditos nucleares era evidente e manifesta. Seriam, nessa ordem, "restos de núcleo", em fase de eliminação final, num dos termos da *cariorréxe* ou da *cariólise* biológica. No particular, basta chamar a atenção para a divergência quanto ao processo de eliminação do núcleo no eritroblasto. Partidários uns da *picnose*, outros defendendo a *cariólise*. A expressão *cariorréxe* é impugnada por muitos na fisiologia e sim melhormente ajustada aos fenômenos patológicos.

O caráter foi discutido chegando alguns a reconhecer a juventude da célula reticulada porém em caminho de degenerescência e não de maturação fisiológica conforme cita Policard :

"La nature exacte des ces granulations est inconnue et leur signification discutée, certains voient dans les hematies qui les referment, des éléments jeunes, mais en voie de dégénérescence".

A policromatofilia foi relacionada com a presença da *reticulocitose* como foi esboçada a correlação com as mitocôndrias, postas a luz por técnicas especiais de coloração. Correndo ainda lado ao patológico tentavam confundí-lo com a célula vermelha basófila estando estabelecida a nenhuma conexão com este estado, pronunciando-se Wintrobe: "Whereas diffusely basophilic or stippled red cells are very infrequent in the blood of *normal* persons, appreciable numbers of reticulocytes are regularly found".

Nesse passo andaram os pesquisadores até o conceito prevalente que situa o *reticulócito* na classe dos glóbulos jovens da série vermelha, dando-lhe um lugar na genealogia do eritrócito e atribuindo-lhe o papel de denunciador da regeneração sanguínea e, na sugestão de Todd e Sanford: "probably the best available index of the activity of blood regeneration".

A natureza mesma do *retículo* parece pouco definida e insuficientes as explicativas enquanto que, por outro lado, se firma o conceito de juventude da célula que o apresenta.

Não parece padecer dúvidas êsse caráter de juventude do *reticulócito*, cuja presença no sangue é um sinete da atividade regeneradora e do trabalho da medula óssea, seja em estado normal, seja em estado patológico com a emigração em elevado número de *reticulócitos* para os vasos e para o sangue circulante, em resposta às necessidades fisiológicas de maior volume de eritrócitos, conforme indica Varela :

"Cuando se intensifica la eritropoiesis aumentan también los reticulocitos; por eso la reticulocitosis es casi siempre un fiel reflejo de la hiparactividad del eritrón".

A presença da *reticulocitose* em sangue embrionário e em sangue de recém-nascidos em elevadas proporções parece corroborar a assertiva que vimos desenvolvendo, talqualmente outros ensaios feitos neste sentido, bastando ressaltar uma indicação, ainda de Varela :

"... los eritroblastos e los reticulócitos consumen mucho oxígeno, propiedad que se ha utilizado para apreciar la cantindad de elementos juveniles que hay en una muestra de sangue (Morawitz)." *

(*) Bibliografía

V I

O fato de se evidenciar a presença de *reticulocitose* em estados patológicos, hemopáticos ou de outra gênese, não infirma o conceito biológico do *reticulócito* nem o desloca de seu lugar na progênie da série vermelha como glóbulo predecessor do eritrócito. (Fig. 2, pg. 41)

Em muitos estados patológicos se produz *reticulocitose*.

No quadro de certas *anemias*, o *reticulócito* é uma figura constante. Não falha na hematologia da *anemia perniciosa*, precisamente na fase regenerativa. Responde com um aumento significativo à *sideroterapia* e à terapêutica pelo *extrato de fígado*, constituindo o "test" de sua avaliação um fator de prognóstico.

Acompanha as *anemias hemolíticas*, aparecendo como elemento constante. Alista-se no panorama hemático das *anemias por intoxicação* de origem química: *plúmbica* entre outras. Há discretos registros no quadro das *intoxicações pelas sulfonas*. E inscreve-se, às vezes, entre as figuras de *anemias consequentes a espoliações e carências* (repetidas hemorragias) como ocorrendo à necessidade de melhor eritrocitose.

Na *leucemia*, na *anemia tipo Lederer*, há frequentemente *reticulocitose*.

Janini, referindo o achado da *reticulocitose* em sangue periférico (sem causas conhecidas) indigita como suspeita de hemorragia oculta e aconselha a pesquisa:

"Boa pista diagnóstica para muitos processos do tubo digestivo: úlcera gastro duodenais, verminoses, retites ulcerativas".

As cifras referidas da *reticulose* no quadro das *anemias* é variável, alcançando, porém, um nível significa-

tivo. De 5 a 20 %, podendo atingir até de 50 % (Wintrobe). Marcando de 29 % a 50 % (Karccke). Vai de 14 a 20 % (Chauffard e Fiessinger). Assinala 4 a 11 % (Troisier). Mais de 20 % Widal — Abrami — Burlé. Acima de 50 % (Varela) Nesta curva irregular de frequência há, até, o registo de 65 % e, excepcionalmente, 92 % (Wintrobe) e 90 % em casos extremos (J. H. Cascão de Anciães). * (Fig. 3 pg. 43)

O Prof. Octavio Torres, segundo referência verbal que nos fez, estudou em 1913 o processo da *coloração supravital* do sangue, em diversos estados mórbidos, observando o pesquisador que no sangue de alguns pacientes acometidos de febre amarela, com icterícia, internados naquela época no Hospital do Isolamento (atual Hospital Couto Maia), havia numerosas hemátias com *reticulo filamentar* (10 a 15 %), além de outras com granulações sudanófilas, na percentagem de 15 a 20 %.

Quando nos defrontamos com cifras superiores a 5% já podemos falar de *reticulocitose* cujo significado o curso de outras investigações esclarecerá.

Um dos mais sugestivos usos da contagem *reticulocítica* é expresso nos testes de aproveitamento da terapêutica pelo fígado, fazendo-se a contagem prévia das células e após administração de extrato de fígado no valor de 1 unidade intramuscular diária. Aplica-se a fórmula.

$$R = \frac{82 - 22 Eo}{1 \% 0,5 Eo}$$

R é o máximo de reticulócitos por cento e *Eo* é o mínimo de células vermelhas contadas antes.

(*) Bibliografia

Fisiològicamente a *reticulocitose* é manifesta no sangue do recém-nascido e do lactente. Diferentes percentagens não sido anotadas :

Todd e Sanford	1 a 4 por cento
Wintrobe	2 a 6 " "
Varela	10 a 20 " "
Aubertin	15 " "
Kato	1.7 " "
Ferrata	"molto numerosi"
Outros referem	5 a 10 por cento

No sangue do prematuro. Durante a gestação, embora associem alguns a fatores anêmicos.

Altas cifras registam-se no sangue do embrião. De 6 até 50 %.

Impunha-se um estudo detido das taxas normalmente encontradas no sangue de indivíduos adultos para que se pudesse julgar a significação da *reticulose*.

O ponto de partida é sempre o normal, e ao patológico outro conceito não cabe senão considerá-lo em tôdas as suas manifestações "una varición de lo fisiológico" *

Podemos aferir as nossas conclusões pelos números expressos no quadro seguinte, colhido na seara de muitos pesquisadores entre os quais transcrevemos :

(*) Bibliografía

Autores	Reticulócitos (porcentual em adultos)
Isaacs	0.3 a 0.7 por cento
Ferrata	1.0 a 2.0 " "
Kracke	0.5 a 1.0 " "
Cascão de Anciães ...	2 " "
Bailey	1.0 " "
Aubertin	0.5 " "
Todd and Sanford (média)	0.6 a 0.8 " "
Todd and Sanford em est. de med. sadios	0.3 a 1.0 " "
Varela	0.5 a 1.0 " "
Janini	0.5 a 1.0 " "
Wintrobe	0.5 a 1.5 " "
Trachtenberg	0.5 a 1.5 " "
" tipo ponteadado	5.9 " "
Kolmer e Beorner de .	1.0 " "
Ederle	2.6 " "
Schulten	0.3 a 1.5 " "
Etcheverry	0.1 a 1 " "
Gradwohl	1 a 2 por 500

VII

Examinadas preparações de sangue fresco, *corado supravitalmente*, os glóbulos vermelhos tomam côres diferentes, conforme o corante usado, tingindo-se homogeneamente e apresentando o aspecto clássicamente descrito de pequenos discos bicôncavos, isolados, empilhados ou enfileirados.

Alguns, entreposto, mostram outra fisionomia, como riscados de traços muito leves. São os *reticulócitos*. Desenham-se de fino *reticulo filamentososo* como se fôsse uma meada de fios muito finos desfiada sôbre a superfície do eritrócito, ou um esboço de trama delicada tecida sôbre o glóbulo. Um leve filamento enovelado ou fragmentado parece, vez por outra, mais espesso, mais condensado, mais cromático, menos contínuo e até cede o passo a imagens de feitiço granuloso, pontilhando aqui e ali a face do glóbulo. (Fig. 4, pg. 43)

Situado, vezes, no centro, destacando-se em suas tintas mais escuras, contrasta com a porção menos corada e mais brilhante do eritrócito normal. Vezes, demanda a periferia da célula quase recobrimdo-a totalmente ou assumindo posições excêntricas.

Esta substância basófila ou ortocromática (Ferrata) apresenta eletividade pelos *corantes vitais*, tingindo-se mais ou menos intensamente conforme a sua distribuição na intimidade dos glóbulos, lembrando, ao longe, a sua representação, os passos mágicos da dança cromática nos ensaios de sua maravilhosa coreografia para a composição artística das mitoses.

Considerando a riqueza do reticulo, a sua distribuição e disposição, foram aventadas classificações do *reti-*

culócito, que, seguindo Heilemeyer * preenche quatro tipos distintos :

Tipo I — substância granulosa mais condensada a jeito de pseudo núcleo.

Tipo II — substância distribuída em delicado retículo.

Tipo III — retículo incompleto

Tipo IV — ponteadado ou granuloso. (Fig. 5, pg. 43)

As dimensões e o volume do glóbulo em questão vêm indicados como superiores ao normal comparado com os demais eritrócitos no campo analisado.

Este caráter particulariza a sua presença.

Parece dotado de maior poder de adesão ou fixação de corpos estranhos como se realizasse o fenômeno da *atrocitose* desenvolvido por certas células que incorporam substâncias do meio ao seu protoplasma. Cita-se ainda, certo retardamento de motilidade, fazendo paralelo entre os demais eritrócitos.

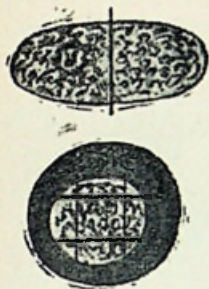
São particularidades atribuídas aos glóbulos estudados e que poderão facilitar descobri-los e individualizá-los, entre as sutilezas de sua pesquisa.

Pelo método usado de *coloração supravital* nos ensaios que realizamos com a solução a 1 % de azul cresil brilhante, os *reticulócitos* tomaram a côr azul escura, enquanto as hemátias apresentaram a côr verde amarelo, nas preparações úmidas e o tom rosa vivo na contra coloração pelo Wright.

A distribuição desigual do retículo não permitia, porém, enquadrá-los num dos 4 tipos descritos, conforme assinalaremos no capítulo das observações experimentais.

(*) Bibliografia

FIGURA N. 1

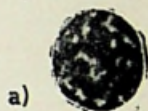


(Reprod. de Schulten e vários)

Contagem de reticulócitos :

Diafragma ocular — Retângulo
feito com fios de cabelo, num pe-
queno disco de cartolina.

FIGURA N. 2



(Reprod. de Varela)

Maturação do eritrócito :

- a) eritroblasto policromatófilo
- b) normoblasto
- c) reticulócito
- d) eritrócito

FIGURA N. 3



(Reprod. de Varela)

Reticulocitose intensa: caso de icterícia hemolítica. Coloração supravital pelo azul de cresil brilhante.

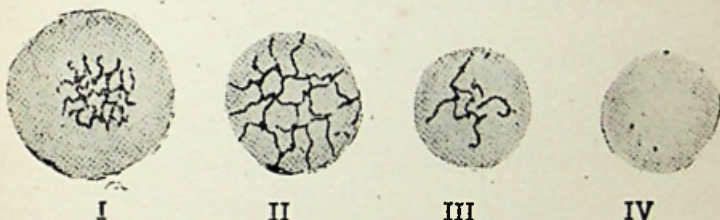
FIGURA N. 4



(Reprod. de Wintrobe)

Reticulócitos: eritrócitos finamente desenhados de retículo.

FIGURA N. 5



(Reprod. de Varela)

Quatro tipos de reticulócitos: diferenças na distribuição e disposição da substância-retículo-filamentosa. Classificação de Heilemeyer.

Observações experimentais

VIII — escolha da amostra

IX — quadro dos achados

X — conclusões

VIII

Trabalhamos com dois grupos de indivíduos considerados normais.

O primeiro de 100 crianças, a partir de 4 até 12 anos de idade.

Tratava-se de coletividade fechada porisso que eram internandos do Preventório Santa Teresinha. A observação clínica permanente que nos é possibilitada pelo cargo de direção que ocupamos na Instituição, os exames periódicamente realizados, a profilaxia das verminoses rigorosamente instituída, permitiram-nos assegurar a validade da amostra, considerando-a adentro da normalidade requerida para o desempenho do trabalho que nos propusemos.

O segundo grupo era constituído de adultos de 18 até mais de 50 anos.

Conduzimos a observação jamais examinando ao microscópio além de dez lâminas e voltando, em cada secção, às vezes, a repetir as análises.

Em primeiro plano fizemos ensaios com vários corantes e técnicas diversas, preconizadas pelos diferentes autores referidos no corpo dessa tése.

Firmamos a preferência pelo azul de cresil brilhante no método descrito.

Em sequência dividimos as crianças por sexo e por grupo etário, em quatro parcelas :

1.º — sexo feminino

a) de 4 a 7 anos

b) de 8 a 12 anos

2.º — sexo masculino

a) de 4 a 7 anos

b) de 8 a 12 anos

Os adultos representaram um grupo único, sem distinção por sexo ou idade, em virtude de se tratar de número pequeno.

Muitos vícios de técnica invalidavam os resultados, voltando-se à repetição de novas preparações. Destacamos, como advertência, já a quantidade de corante, já a espessura do sangue distendido. Para evitar impecilhos usamos pipêtas de diâmetro capilar, uniformizando o tamanho da gota de corante usado.

As alterações morfológicas ocorridas nas hemátias por evaporação de água, as retenções de bolhas de ar entre lâmina e laminula foram, quanto possível, cuidadosamente evitadas.

Contamos 2.000 glóbulos vermelhos em cada preparação, estabelecemos a proporção, aplicando a fórmula de Kolmer.

A morfologia dos reticulócitos já inscrevemos nas páginas precedentes, verificando-se, na maioria dos casos, o caráter particular de ligeiro aumento de tamanho do *glóbulo reticulado*, entre os demais, livres de retículo, no mesmo campo. Não aventuramos, entretanto, a concordância com aqueles que apontam particulares capacidades adesivas aos corpos estranhos ou grumos de corantes, nem atestamos com a nossa verificação certo retardamento na motilidade dos eritrócitos portadores de filamentos, porisso que não chegamos a esta observação.

Deparamos um caso de moderada reticulocitose (6%) apurando-se pequenas metrorragias e suspeita clínica de úlcera duodenal, excluindo-se-o da amostra considerada biológica. Noutro ainda, de contagem igual a 7%, tratava-se de anemia por espoliação periódica, comprovada por hemograma de Schilling, ficando igualmente eliminado do quadro.

Passamos à demonstração dos números encontrados, grupados como referimos ou reunidos em quadro único.

Desejosos estivemos de estabelecer distinções entre os grupos representantes de três raças. Predominavam, todavia, os miscigenados, não permitindo paralelo conclusivo.



IX

Contagem de reticulócitos pelo método de coloração supravital do sangue

Crianças		Sexo feminino	
Grupo etário	Número	Eritrócitos contados por lâmina	Reticulócitos (porcentual)
4 a 7 anos	22	2.000	0. 7 %
8 a 12 anos	28	2.000	0. 8 %

Crianças		Sexo masculino	
Grupo etário	Número	Eritrócitos contados por lâmina	Reticulócitos (porcentual)
4 a 7 anos	20	2.000	0. 9 %
8 a 12 anos	30	2.000	0. 75 %

QUADRO ÚNICO

Crianças

Grupo etário	Número	Eritrócitos contados	Reticulócitos (porcentual)
4 a 12 anos	100	200.000	0.78 %

Adultos

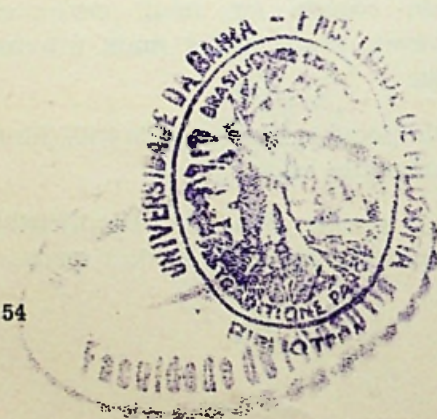
Grupo etário	Número	Eritrócitos contados por lâmina	Reticulócitos (porcentual)
20 a mais de 50 anos	20	2.000	0.33 %



CONCLUSÕES

- I) — O método da coloração supravital do sangue reveste-se de simplicidade e garante, por certo tempo, a sobrevivência da célula.
- II) — Por esses atributos constitui boa técnica de investigação biológica e de trabalhos didáticos, fornecendo fiéis informes respeito a morfologia e certas atividades das células.
- III) — Constitui, igualmente, um dos recursos para os testes biológicos aplicados à patologia e à eficiência de terapêutica pelo ferro e pelo extrato de fígado.
- IV) — O azul de cresil brilhante, na técnica usada, permite boas preparações, sendo o corante vital mais largamente usado e recomendado por diferentes autores, no particular da pesquisa de *reticulócitos*.
- V) — Os leucócitos não mostraram, na maioria das preparações, examinadas dentro de 15 a 20 minutos, coloração nuclear. Só o citoplasma apresentava-se corado em azul, entremostrando, às vezes, granulações mais intensamente coradas.
- VI) — A taxa de reticulócitos no sangue de indivíduos normais é realmente baixa.
- VII) — Não houve, no grupo estudado, significativa diferença de porcentual entre os dois sexos.

- VIII) — Pelas doutrinas que focalizamos, pelo estudo das anemias e das curvas de reticulocitose em resposta a administração de extrato de fígado e de ferro, aceitamos o conceito que estabelece um lugar ao *reticulócito* no ciclo de maturação do eritrócito, como seu precursor, e como índice de regeneração e atividade da medula óssea.
- IX) — Diferentes desenhos mostravam os eritrócitos reticulados e ligeiro aumento de dimensões, confrontados com os vizinhos.
- X) — Não foi possível, todavia, enquadrá-los na classificação de Heilemeyer, nem deduzir outras particularidades.
- XI) — Encontramos o porcentual de 0. 78 % no primeiro grupo e 0. 33 % no segundo, cifras concordantes com a maioria dos autores consultados.
- XII) — Pretendemos determinar índices não estudados entre nós e marchamos, no passo da investigação, para a próxima análise de um grupo de recém-nascidos.



Bibliografia

- AUBERTIN, Ch. — Encyclopédie Médico-Chirurgicale — Vol — Sang — A. Laffont — Durieux.
- ARON, M. et GRASSÉ, P. — Précis de Biologie Animale — 1939.
- BRANCA, A. — Précis d'Histologie — 1910.
- BOUIN, P. — Éléments d'Histologie — 1929.
- BAILEY, FREDERIK, R. — Text Boock of Histology — 1944.
- BULLARD, H. et CHAMPY, Ch. — Abrégé d'Histologie — 1947.
- BÉCART, AUGUSTE — Le Sang — 1927.
- BEZAŃON F. et LABBÉ, M. — Traité d'Hematologie — 1904.
- BORGES, ANTONIO A. COELHO — Tese: Contribuição ao estudo da hematologia na variola — 1920.
- BOERNER, FRED. and KOLMER, JOHN — Approved Laboratory Technic — 1931.
- CARREL, A. — Tissue culture and cell physiology — Phys. — Rev. Vol. 4 — 1924.
- CHAMPY, CHRISTIAN — Le Sang et les Maladies du Sang, — 1913.
- CORONA, LEONIDAS, T. — Química Normal y Patológica de la Sangre — 1942.
- CASCÃO DE ANCIÃES, J. H. — Elementos de Diagnóstico e Tratamento das Anemias, — Lisboa Médica — Ano XVIII — 8
- COSTA, CELESTINO — P. ROBERTO CHAVES — Manual de Técnica Histológica, 3.^a ed. — 1943.
- CUNNINGHAM, R. S., TOMPKINS, E. H. — The Supravital Staining of Normal Humann Blood Cells — Fol. Hem. 42 — 1930.
- EDERLE in SCHULTEN — Tratado de Hematologia Clínica — Trad. — 1947.
- ETCHEVERRY, M. A. — Anemias — Su Classificación Morfológica — El Dia Médico — 144.
- FERRATA, ADOLFO — Le Emopatie — 1933.
- GILBERT, A. et WEINBERG, M. — Traité du Sang, — 1913.
- GRADWOHL, R. B. H. — Clinical Laboratory Methods And Diagnosis — 1938.
- HALL, B. E — A Critical Review of the Hematological Literature Dealing With the Results of the Supravital Staining Method, Folia Haematologia 43 — 206 — 1930.

- HEILEMEYER — in SCHULTEN — Ob. cit.
- ISAACS, R. The bone marrow in anemia. The red blood cells, American Journal Medical Science — 193, 181, 1937.
- JANNI, PEDRO — Interpretação Clínica do Hemograma — 1949.
- JIMENEZ, DIAZ, C — Lecciones de Patología Médica — 1942.
- KRACKE, ROY — Doenças do Sangue e Atlas de Hematologia — Trad. 2.^a edição — 1943.
- KOLMER, JOHN, A. and BOERNER, FRED. — Approved Laboratory Technic (Ob. cit.,) 1931. .
- LENHARTZ, H. e MEYER E. — Trad. F. Pinero — Análisis Clínicos — 1932.
- LILLIE, R. D. — Histopathologic Technic — 1948.
- MCCORD, C. P. HOLDEN, F. R. JOHNSTON, J. — Basophilic test in the lead poisoning epidemic de 1934 — 1935 — Am. Jour. Pub. Health, 25, 1089, — 1935.
- POULSEN, H. E. — Granulations basofiles des globules pendent la chrysotherapie — Acta Med. Scandinav. — 1936, 5, 396 — 24-2-1950.
- POLICARD, A. — Précis d'Histologie Physiologique — 1922.
- RENOUX, G. — Coloration panoptique rapide des préparations, hématologiques — Revue d'Hematologie. 5, 1 1950.
- SHARP, LESTER — Fundamentals of. Cytology — 1943.
- SCHULTEN, HANS — Tratado de Hematologia Clínica — Trad. 2.^a ed. por M. de La Poza — 1947.
- SANFORD and TODD — Clinical Diagnosis By Laboratory Methods — 10.^a ed. — 1944.
- SCHILLING, V. — El Cuadro Hemático y Su valor en La Clinica 2.^a ed. — 1934.
- SANTOS, MARIO ANDRÉA Dos — Histologia e Embriologia Geral, V. I-1945.
- SANTOS, MARIO ANDRÉA Dos — Técnica Histológica — 1926.
- TODD and SANFORD — Ob. cit.
- TURCHINI, JEAN — Cellule Embryologie — 1943.
- TORRES, OCTÁVIO — Trabalho inédito. (Notas de Laboratório)
- VARELA, M. E. — Hematologia Clínica — 1946.
- WINTROBE, — M. M. — Clinical Hematology — 1944.
- WILSON, E. B. — The Cell in Development and Heredity — 1925.
- WEIDENREICH, — Le Globule Rouge Normal — in Gilbert et Weinberg — Traité du Sang — 1913.



Composto e impresso na EDITORA MENSAGEIRO DA FÉ.

C
P