

SEPARATA DE
PORTUGALIAE ACTA BIOLOGICA
Série A — Vol. VI — N.º 3-4 — págs. 179 a 210
LISBOA — 1962

SOBRE A CONSTITUIÇÃO E FISIOLOGIA
DAS PLAQUETAS SANGUÍNEAS

por

J. F. DAVID-FERREIRA

(Laboratório de Microscopia Electrónica Calouste Gulbenkian)

SOBRE A CONSTITUIÇÃO E FISIOLÓGIA DAS PLAQUETAS SANGUÍNEAS ⁽¹⁾

por

J. F. DAVID-FERREIRA *

(Laboratório de Microscopia Electrónica Calouste Gulbenkian) ^(†)

Recebido em 29 de Dezembro de 1961.

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO	179
MATERIAL E MÉTODOS	181
A ULTRAESTRUTURA DAS PLAQUETAS	183
A PROPRIEDADE FAGOCITÁRIA DAS PLAQUETAS	191
ORIGEM E MORTE DAS PLAQUETAS	197
CONCLUSÕES	202
BIBLIOGRAFIA	206

INTRODUÇÃO

Os elementos sanguíneos hoje conhecidos com o nome de plaquetas ou trombocitos, foram observados pela primeira vez em 1842 por DONNÉ, que os descreveu com o nome de *globulinos*. Cinco anos mais tarde, ZIMMERMAN assinalou a sua tendência a aglutinarem-se e chamou-lhes *vesículas elementares*. A estes trabalhos, segue-se um silêncio de mais de vinte anos, até que em 1874 OSLER lhes torna a fazer referência sob a designação de *terceiro elemento do sangue*, atribuindo-lhes assim pela primeira vez um carácter autónomo dos outros elementos sanguíneos. Mas o estudo das plaquetas só adquiriu o relevo que merecia, depois dos trabalhos de HAYEM (1877) e BIZZOZERO (1882) a quem, por essa razão, habitualmente se atribui a sua descoberta. HAYEM (1877) identificou-as no sangue de um grande número de vertebrados e designou-as *hematoblastos* pois seriam, segundo este autor, os precursores

* Bolseiro do Instituto de Alta Cultura.

(1) 1.º Prémio Pfizer 1961.

(2) Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina, Lisboa-Portugal.

Homenagem ao Prof. E. HEITZ no seu 70.º aniversário.

Com a criação das técnicas da ultramicrotomia, que deram à microscopia electrónica as possibilidades que hoje lhe conhecemos, iniciou-se um novo capítulo no estudo das plaquetas sanguíneas. Tornou-se possível investigar e descrever de forma precisa a sua ultraestrutura e foram criadas novas possibilidades no estudo da sua fisiologia e fisiopatologia.

No decurso deste trabalho analisaremos, à luz das novas técnicas, a ultraestrutura das plaquetas sanguíneas em várias situações experimentais, expondo os resultados que obtivemos no estudo destes elementos com o microscópio electrónico.

MATERIAL E MÉTODOS

As observações e conclusões apresentadas neste trabalho são o resultado do estudo ao microscópio electrónico dos seguintes materiais:

a) Plaquetas humanas isoladas de sangue de indivíduos normais.

As suspensões de plaquetas foram preparadas a partir de sangue humano obtido por punção venosa. A técnica utilizada para o isolamento foi a seguinte: Imediatamente a seguir à colheita centrifuga-se o sangue com 1/9 do seu volume de citrato de sódio a 3,8% durante 20 minutos a 500 r.p.m. A camada de plasma sobrenadante é decantada e centrifuga-se de novo durante 15 minutos a 4000 r.p.m. numa centrifuga refrigerada a -4°C . O sedimento obtido trata-se seguidamente como um fragmento de tecido.

b) Plaquetas humanas isoladas de sangue de indivíduos normais e postas em contacto «in vitro» com dióxido de tório coloidal.

O sedimento, obtido pela técnica descrita no parágrafo anterior, suspende-se em citrato de sódio a 3,8% a que se juntou 2 gotas de dióxido de tório coloidal. Esta suspensão é

dos glóbulos vermelhos. BIZZAZERO (1882) descreveu-as no sangue de um animal vivo, defendeu a sua completa independência dos outros glóbulos de sangue, e designou-as pela primeira vez com o nome de *plaquetas*.

Após um longo período em que os trabalhos sobre as plaquetas, tiveram como tema essencial a sua caracterização morfológica, e a discussão da sua independência dos outros elementos sanguíneos, os estudos sobre as plaquetas tomaram progressivamente um carácter predominantemente fisiológico e fisiopatológico. A sua descrição morfológica adquiriu maior precisão, e a sua importância nos fenómenos da coagulação, foi-se esclarecendo progressivamente. Para estes trabalhos, teve uma importância primordial a descrição de técnicas que tornaram possível o seu isolamento das outras células sanguíneas.

O pequeno tamanho das plaquetas, que não permitia observações muito detalhadas, limitou sempre o seu estudo morfológico. Com a descoberta do microscópio electrónico, que abriu às investigações biológicas novas perspectivas, criaram-se condições para um notável avanço nos conhecimentos morfológicos. A pequenez das plaquetas, que as tornava um material de estudo difícil na microscopia óptica, constituía só por si uma indicação para o emprego do microscópio electrónico. Por isso, numa época em que as técnicas para a aplicação deste aparelho aos estudos biológicos eram ainda primitivas, o pequeno tamanho das plaquetas e a sua propriedade de se estenderem, o que lhes diminuía a espessura, tornou-as um dos poucos materiais biológicos cuja observação era possível. Data de 1939 o trabalho de WOLPERS e RUSKA que relata a primeira observação das plaquetas com o microscópio electrónico. Este trabalho, realizado ainda nos laboratórios em que von BORRIES e RUSKA construíram o microscópio electrónico, foi dos primeiros em que este aparelho foi utilizado em biologia. Segue-se um silêncio que corresponde ao período da última guerra. Depois, desde 1948 até 1955, publicaram-se numerosos trabalhos em que as plaquetas normais e patológicas foram estudadas com as técnicas do estendimento e da metalização (ver bibliografia in: KÖPPEL (1958) e MARCOVICI e GAUTIER (1959)).

Com a criação das técnicas da ultramicrotomia, que deram à microscopia electrónica as possibilidades que hoje lhe conhecemos, iniciou-se um novo capítulo no estudo das plaquetas sanguíneas. Tornou-se possível investigar e descrever de forma precisa a sua ultraestrutura e foram criadas novas possibilidades no estudo da sua fisiologia e fisiopatologia.

No decurso deste trabalho analisaremos, à luz das novas técnicas, a ultraestrutura das plaquetas sanguíneas em várias situações experimentais, expondo os resultados que obtivemos no estudo destes elementos com o microscópio electrónico.

MATERIAL E MÉTODOS

As observações e conclusões apresentadas neste trabalho são o resultado do estudo ao microscópio electrónico dos seguintes materiais:

a) Plaquetas humanas isoladas de sangue de indivíduos normais.

As suspensões de plaquetas foram preparadas a partir de sangue humano obtido por punção venosa. A técnica utilizada para o isolamento foi a seguinte: Imediatamente a seguir à colheita centrifuga-se o sangue com 1/9 do seu volume de citrato de sódio a 3,8% durante 20 minutos a 500 r.p.m. A camada de plasma sobrenadante é decantada e centrifuga-se de novo durante 15 minutos a 400 r.p.m. numa centrifuga refrigerada a -4°C . O sedimento obtido trata-se seguidamente como um fragmento de tecido.

b) Plaquetas humanas isoladas de sangue de indivíduos normais e postas em contacto «in vitro» com dióxido de iório coloidal.

O sedimento, obtido pela técnica descrita no parágrafo anterior, suspende-se em citrato de sódio a 3,8% a que se juntou 2 gotas de dióxido de iório coloidal. Esta suspensão é

colocada na estufa a 37°C, por períodos de 15 minutos e 1 hora. Seguidamente centrifuga-se a suspensão durante 10 minutos a 4.000 r.p.m. O sedimento obtido trata-se seguidamente como um fragmento de tecido.

O material utilizado em *a)* e *b)* foi previamente siliconado com Dri-Film.

***c)* Pulmão, Baço e Medula óssea de coelhos injectados com dióxido de tório coloidal.**

Estes órgãos foram colhidos de animais injectados por via endovenosa (veia marginal da orelha) com 1c.c. de uma solução de dióxido de tório coloidal, por quilograma peso.

Os animais foram sacrificados em períodos variando de 3 minutos a 5 dias após a injeção.

***d)* Baço e medula óssea de Ratinho.**

Após ligeira anestesia pelo éter dos animais, foram colhidos fragmentos do baço e de medula óssea (tuberosidade da tibia).

***e)* Baço e medula óssea de Ratinhos injectados com dióxido de tório coloidal.**

Estes órgãos foram colhidos de animais injectados por via peritoneal com 1c.c. de uma solução de dióxido de tório coloidal por quilograma peso. Os animais foram sacrificados 48 horas após a injeção.

Após o isolamento (plaquetas humanas) ou a colheita, os fragmentos foram fixados durante 1 hora no frigorífico em ácido ósmico a 1% tamponado a pH 7,2. Depois de uma rápida lavagem em água destilada, os fragmentos foram desidratados em alcoóis de concentração crescente (70°, 90°, alc. absoluto) após o que foram incluídos em metacrilato de *n*-butilo. Os cortes feitos no ultramicrotomo de Porter-Blum, com facas de vidro, foram recolhidos em grelhas cobertas de formvar e observadas no microscópio RCA EMU 3C a um potencial de 100 KW.

Algumas das grelhas dos cortes observados, foram coradas pelo acetato de uranilo, que não só deu às preparações um nítido aumento de contraste, como facilitou a identificação de novos detalhes estruturais. Segundo a técnica de WATSON (1958) colocam-se as grelhas cobertas de cortes a flutuar num soluto saturado de acetato de uranilo em álcool 50°, de forma que a superfície das grelhas que contém os cortes esteja em contacto com o soluto. Passados 90 minutos as grelhas passam-se por água destilada, e deixam-se secar após o que estão em condições para se observarem no microscópio. Obtivemos bons resultados com a seguinte modificação desta técnica. Em vez de proceder à coloração com acetato de uranilo imediatamente após a recolha dos cortes observamos previamente as grelhas ao microscópio electrónico sem coloração. Desta forma seleccionamos as preparações que merecem ser coradas e diminuímos a sua espessura, devido à sublimação do metacrilato que se verifica quando os cortes são expostos durante algum tempo ao feixe de electrões. Esta técnica parece-nos diminuir o aspecto grosseiro de muitas preparações quando coradas pelo acetato de uranilo.

De todas as colheitas foram feitos no ultramicrotomo cortes mais espessos que se colaram em lâminas de vidro com albumina de MEYER. Depois de se retirar o metacrilato, com clorofórmio ou benzeno, foram corados com hemalum-eosina ou com o método de Mac-Manus e observados no microscópio óptico.

A ULTRAESTRUTURA DAS PLAQUETAS

Num esfregaço de sangue humano corado pelo método de Leishmann, as plaquetas apresentam-se, quando observadas ao microscópio óptico, como pequenos corpúsculos redondos ou ligeiramente ovóides, isolados ou formando pequenos aglomerados. Com diâmetro aproximado de 3 μ têm os contornos a maior parte das vezes irregulares. São formadas por uma substância fundamental homogénea, incolor ou ligeiramente basófila, na qual se observam dispersos ou formando um pequeno agrupamento central grânulos corados de roxo.

É habitual chamar-se à substância fundamental *hialómero*, e ao conjunto dos grânulos corados *cromómero* ou *granulómero*.

A observação com o microscópio electrónico, de cortes de plaquetas humanas isoladas por centrifugação, mostra-nos elementos bem limitados por uma membrana, cujos contornos são irregulares. No seu interior, no seio de uma substância fundamental finamente granulosa (*hialómero*), observam-se pequenos grânulos densos e vacúolos, que algumas vezes se acumulam na região central da plaqueta. Correspondem ao *granulómero* observado com o microscópio óptico (Fig. 1).

O aspecto geral das plaquetas que observámos no interior dos capilares do pulmão do Coelho, é idêntico, mas são geralmente mais alongadas e nota-se maior regularidade no contorno da membrana.

Em fotografias a fraca ampliação, é possível identificar entre as plaquetas humanas com o aspecto geral que descrevemos, outras mais claras, como que vazias de toda a substância fundamental mas contendo ainda no interior os corpúsculos densos característicos do *granulómero*. De uma forma geral os contornos destas plaquetas são mais regulares (Figs. 1 e 2).

Membrana — A existência nas plaquetas de uma membrana limitante, foi durante muito tempo posta em dúvida. Ainda em 1954, num livro dedicado ao estudo das plaquetas, MAUPIN faz a seguinte observação inspirada em TULLIS: «*parmi les acquisitions de la morphologie pure, nous retiendrons: l'absence de forme propre, ou plus exactement la grande plasticité des plaquettes qui semble indiquer qu'elles sont démunies de membrane*». Esta ausência de uma membrana limitante, constituiu um dos argumentos em que se basearam vários autores ao negarem às plaquetas natureza celular.

Nos cortes de plaquetas, observados com o microscópio electrónico, a existência de uma membrana que é nítida, torna-se particularmente evidente nas preparações coradas pelo acetato de uranilo. Tem uma espessura aproximada de 78 Å e a sua constituição aprecia-se com maior facilidade nas *plaquetas «claras»*, em que o desaparecimento da substância fundamental torna mais nítidos os seus contornos (Fig. 2).

Como veremos na segunda parte deste trabalho esta membrana que sob o aspecto morfológico é idêntica a uma membrana celular, comporta-se também fisiologicamente como tal.

Hialómero — A substância fundamental das plaquetas, onde se encontram dispersos os elementos que constituem o *granulómero*, é geralmente homogênea ou finamente granulosa. Pode apresentar-se mais ou menos densa e algumas vezes como acontece nas *plaquetas «claras»* parece ter desaparecido completamente (Figs. 1 e 2). Variações na densidade do *hialómero* foram descritas por FEISSELY, GAUTIER e MARCOVICI (1958) num estudo sobre as modificações das plaquetas no sangue conservado. Segundo estes autores o número de *plaquetas «claras»*, como que vazias de toda a substância fundamental, aumenta com o tempo de conservação do sangue. É pois provável que as *plaquetas «claras»* que observamos nas nossas preparações sejam elementos em vias de degenerescência.

Ao contrário do que é habitual em quasi todos os tipos celulares, não se observam na substância fundamental das plaquetas os característicos grãos de Palade ou ribosomas. Este facto está de acordo com as pesquisas histoquímicas realizadas por vários autores, segundo as quais não existe nas plaquetas A. R. N. É curioso constatar, que as plaquetas e os glóbulos vermelhos, únicos elementos do nosso organismo que não tem núcleo, são também os únicos desprovidos de grãos de Palade e portanto A. R. N.

Granulómero — Depois dos trabalhos de SCHULZ, JØRGENSEN e HIEPLER (1958) dividem-se os componentes do *granulómero* em quatro grupos: *granulómero α*, *β*, *γ* e *δ*. Analisemos separadamente a constituição de cada um.

Granulómero α — Os grânulos que constituem o *granulómero α*, geralmente ovulares, são o elemento mais abundante do *granulómero* (Fig. 3). Com 120 a 300 mμ de diâmetro estes grânulos estão rodeados por uma membrana que segundo SCHULZ e HIEPLER (1959) é simples e tem cerca de 50 Å de

espessura. Segundo as nossas observações, tanto nas plaquetas humanas como do coelho, pode reconhecer-se na membrana de muitos grânulos α três folhetos, dois exteriores densos com 40 Å cada e um médio menos denso com 50 Å. A espessura total da membrana é de 130 Å.

Os grânulos α , que segundo investigações realizadas por vários autores (RINEHART 1955; QUEYASU e TAGESHIGE 1956; GOODMAN, REILLY e MOORE 1957) correspondem às granulações azurófilas observados com o microscópio óptico, são densos (*granulações densas* de FEISLY, GAUTIER e MARCOVICI) e tem um conteúdo finamente granuloso. Em preparações coradas com acetato de uranilo os seus grânulos são ligeiramente mais densos.

No interior dos grânulos α vêm-se algumas vezes zonas homogêneas mais densas e geralmente excêntricas. Outra particularidade, também muito frequente, é o de grânulos com pequenas lobulações na sua superfície (DAVID-FERREIRA, 1961).

Granulômero β — É assim chamado o conjunto de mitocôndrias de uma plaqueta. Geralmente pouco numerosas (1 a 2 por plaqueta) são pequenas (0,20 μ) e possuem um número muito pequeno de cristas (2 a 3) (Fig. 3). A pequena actividade respiratória das plaquetas está certamente de acordo com o pequeno número e tamanho das suas mitocôndrias.

Granulômero γ — Foi assim denominado o conjunto das microvesículas, tubulos e vacúolos que se observam nas plaquetas (Figs. 3 e 4). FEISLY e colab. (1960) dado o seu aspecto deram-lhe o nome de *elementos claros das plaquetas*.

Apesar das características comuns, como por exemplo o seu aspeto claro, podem individualizar-se no granulômero γ dois tipos de componentes: os conjuntos de microvesículas de 200 a 400 Å de diâmetro e os vacúolos isolados maiores com 500 m μ (Figs. 3 e 4).

Várias hipóteses têm sido admitidas sobre a origem e o significado dos elementos do granulômero γ . Para alguns autores as suas vesículas e vacúolos nada mais seriam que elementos do aparelho de Golgi dos megacariócitos precursor-

res, para outros representariam elementos do retículo endoplasmico, para outros ainda seriam vesículas e vacúolos de pinocitose.

Como veremos no último capítulo deste trabalho, observações de ordem experimental levaram-nos à conclusão que pelo menos o componente vacuolar e tubular, resultam de fenómenos de incorporação activa realizados pelas plaquetas. Não excluimos, que os agrupamentos de microvesículas que se observam nalgumas plaquetas, tenham como origem o aparelho de Golgi dos megacariócitos precursores. Constitui contudo uma hipótese dificilmente demonstrável.

É muito provável que os vacúolos maiores que fazem parte do granulômero γ , correspondam ao vacúolo contractil observado por BESSIS e BRICKA (1951) com o microscópio de contraste de fase, em plaquetas humanas isoladas *«in vitro»*.

Granulômero δ — SCHULZ e colab. (1958) descreveram como fazendo parte do granulômero δ , umas formações semelhantes aos citosomas e possuindo no interior uns corpúsculos muito densos, com aproximadamente 55 Å de diâmetro, de aspecto idêntico ao da ferritina. Nas preparações que observei, tanto de plaquetas humanas isoladas *«in vitro»*, como nas plaquetas de coelho observadas no interior dos capilares do pulmão, nunca identifiquei grânulos semelhantes aos descritos por estes autores. POLICARD e colab. (1959) que estudaram as plaquetas do sangue do Rato, afirmam também nunca terem observado grânulos semelhantes.

Qual a origem e o significado dos elementos do granulômero δ ?

Pela sua estrutura, estes elementos são muito semelhantes aos vacúolos observados por GIESERING (1958) em células alveolares do pulmão, depois da injeção de hidróxido de ferro. Este facto serviu-nos de ponto de partida para uma hipótese sobre a origem dos grânulos δ (DAVID-FERREIRA, 1961).

Conforme se demonstra mais adiante, as plaquetas podem incorporar substâncias do meio exterior. A existência de aglomerados de partículas de ferritina no seu interior, pode pois ter resultado de um fenómeno de incorporação.

Tanto mais que não é de estranhar a existência desta substância no plasma.

A razão porque SCHULZ e colab. (1958) referem a observação frequente destes corpúsculos, enquanto que nós próprios nunca os observamos, pode explicar-se atendendo a diferenças na técnica de isolamento das plaquetas. As plaquetas que estudámos foram sempre isoladas imediatamente a seguir à colheita, enquanto que SCHULZ e colab. (1958) deixam durante 15 horas o sangue no frigorífico para sedimentação dos glóbulos vermelhos e brancos. Este período de tempo é suficiente para as plaquetas incorporarem ferritina que se encontre livre no plasma. Admitindo pois que se trata de um fenómeno de incorporação, a diferença da técnica de isolamento utilizada por estes autores pode explicar porque encontram granulações do tipo δ com facilidade.

Além dos constituintes do granulômero que acabamos de analisar, têm sido observados nas plaquetas outros grânulos que não têm sido classificados nestes grupos:

1 — Os grânulos em baqueta de tambor, observados por SCHULZ e colab. (1958) na doença de WILLEBRANDT-JÜRGENS e considerados por estes autores característicos desta trombopatia.

2 — Grânulos de 120 \AA descritos por SCHULZ (1960) com o nome de «liberalisierte α — Substanz».

3 — Grânulos de aproximadamente 200 \AA observados em plaquetas sanguíneas humanas (DAVID-FERREIRA, 1961).

Analizaremos seguidamente os resultados que obtivemos em relação a estes componentes do granulômero. Agrupámos os grânulos do grupo 2 e 3 num conjunto que designamos granulômero ϵ (épsilon).

Grânulos em baqueta de tambor — Nas plaquetas de doentes com a trombopatia constitucional de WILLEBRANDT-JÜRGENS, foram descritos por SCHULZ e colab. (1958) um tipo de grânulos que pela sua forma estes autores designaram grânulos em baqueta de tambor (*Trommelschlegelgranula*).

Com cerca de 1μ de comprimento e com uma largura compreendida entre 500 a 2.000 \AA , estes grânulos são envolvidos por uma membrana e o seu conteúdo tem o mesmo aspecto que as granulações α . Segundo estes autores nos casos que estudaram (cerca de 15), o número de grânulos em baqueta de tambor por plaqueta, era muito variável de caso para caso. Num dos casos foram observados vários destes grânulos por plaqueta, enquanto que noutro só raramente foram encontradas. Segundo SCHULZ e colab. (1958) os grânulos em baqueta de tambor seriam exclusivos das plaquetas de doentes com a doença de WILLEBRANDT-JÜRGENS, nunca se observando nas plaquetas normais. Admitem a hipótese que estes grânulos são uma expressão morfológica da alteração genética que está na base da doença.

Nas plaquetas de sangue normal que examinámos, observámos e não muito raramente plaquetas contendo no seu interior grânulos em baqueta de tambor idênticos aos descritos por estes autores (Fig. 4). São grânulos alongados com aproximadamente $0,6 \mu$ de comprimento e 600 a 700 \AA de largura, em que uma das extremidades ou as duas estão dilatadas ou tem uma forma lanceolada. Rodeiam-nos uma membrana simples e o seu conteúdo tem um contraste idêntico ao dos grânulos α e é ligeiramente granuloso. Este facto permite-nos concluir que estes grânulos não aparecem exclusivamente na doença de WILLEBRANDT-JÜRGENS não se podendo, portanto, considerar característicos da doença. O facto de não termos observado plaquetas da trombopatia constitucional, não nos permite excluir a possibilidade de que o seu número se encontre pelo menos aumentado nalguns dos portadores desta doença.

Granulômero ϵ — BERNHARD e LEPLUS (1955), numa das primeiras observações de cortes finos de plaquetas feitas ao microscópio electrónico, assinalaram a existência nestes elementos de grânulos de Palade, cujo diâmetro médio é de 150 \AA . Também PEASE (1956), num estudo sobre plaquetas sanguíneas do Rato e da Cobaia se refere à existência de grânulos de ARN, que segundo este autor seriam muito abun-

dantes. Posteriormente os autores que têm estudado as plaquetas negam a existência de grãos de Palade o que está de acordo com outros dados, conforme já referimos neste trabalho.

Nas preparações que examinámos, a observação nas plaquetas de grânulos com aspecto e dimensões semelhantes aos grânulos de Palade foi sempre excepcional.

Em cortes de plaquetas humanas isoladas «*in vitro*» SCHULZ (1960) descreve, dispersos no citoplasma pequenos grânulos de 120 Å que este autor denomina «*liberalisierte α -Substanz*». Segundo SCHULZ estes grânulos representariam a dispersão na substância fundamental do conteúdo dos grânulos α .

Só muito raramente identificámos nas plaquetas, grânulos com as características dos descritos anteriormente. Nas plaquetas humanas isoladas «*in vitro*» observámos com muita frequência uns grânulos maiores e mais densos. Dispersos no hialómero ou acumulados em zonas em que a substância fundamental é mais clara, têm aproximadamente 180 a 200 Å de diâmetro são redondos ou ligeiramente ovóides. (Fig. 5, 6 e 7). Algumas vezes fundem-se pelas suas extremidades constituindo pequenos rosários. Nas preparações coradas pelo acetato de uranilo, apresentam-se muito contrastados sendo possível reconhecer-lhe no interior pequenos pontos muito densos com 30 Å de diâmetro (Fig. 7).

Qual o significado destes grânulos?

O facto largamente comprovado, de serem as plaquetas os elementos do nosso organismo mais ricos em serotonina, e o de estarem relacionados com o transporte desta substância no sangue (ZUCKER, 1951; RAND e REID, 1951; BRACCO e CURTI, 1954; HUMPHREY e JAKES, 1954; UNDEFRIED e WEISSBACH, 1954; HARDISTY e SPACEY, 1955), levou-nos a elaborar uma hipótese segundo a qual os grânulos α representavam o substracto morfológico desta substância. Já posteriormente à elaboração deste trabalho pusemos porém em evidência (DAVID-FERREIRA e DAVID-FERREIRA, 1962) que estes grânulos representam o glicogénio das plaquetas.

Classificação dos elementos do granulômero — Os elementos do granulômero classificam-se habitualmente em quatro grupos: α , β , γ e δ . Além dos constituintes destes grupos, foram posteriormente reconhecidos no granulômero por SCHULZ (1960) uns grânulos de 120 Å que este autor denominou «*liberalisierte α -Substanz*» e por nós próprios uns grânulos mais densos com aproximadamente 200 Å de diâmetro (DAVID-FERREIRA e DAVID-FERREIRA, 1962). Não estando estes elementos compreendidos em qualquer dos grupos anteriores, achámos conveniente a criação de um novo grupo, que designámos *granulômero épsilon* (ϵ) e que agrupa todos os grânulos densos de dimensões inferiores a 300 Å. A nomenclatura do granulômero continua assim a manter as características iniciais que tem vantagens de não dar aos elementos morfológicos observados, designações interpretativas, que mais tarde se podem demonstrar erradas.

A PROPRIEDADE FAGOCITÁRIA DAS PLAQUETAS

Uma das propriedades mais repetidamente assinalada nas plaquetas, é a de se fixarem com grande facilidade a todas as superfícies estranhas. Esta propriedade conhecida com o nome de adesividade, e que parece ter sido posta em evidência pela primeira vez, pelos trabalhos de BIZZAZERO (1882), tornou durante muito tempo particularmente difícil o isolamento das plaquetas. Só após a introdução de certos plásticos e do silicone, no revestimento dos recipientes utilizados para o seu isolamento, foi possível ultrapassar a dificuldade de isolar estes elementos.

Um outro aspecto da adesividade das plaquetas, é a de fixarem com grande facilidade, quaisquer partículas estranhas com que se ponham em contacto «*in vitro*». Desta característica, largamente comprovada por numerosas experiências, resulta um facto importante sob o ponto de vista fisiológico. Se as plaquetas fixam com facilidade partículas na sua superfície, é possível que estes elementos eliminem da circulação partículas estranhas. Assim graças à sua propriedade da

adesividade, as plaquetas interviriam na defesa do organismo (BLOOM e colab., 1955).

Em investigações sobre tuberculose experimental do Coelho, COPLEY e colab. (1960) assinalam, que a primeira reacção do organismo à injeção endovenosa de uma suspensão de B. C. G. seco é a aglutinação das plaquetas e a adesão das bactérias. Segundo estes autores «*Ce phénomène extraordinaire*», a reacção instantânea das plaquetas, «*n'est pas provoqué uniquement par les mycobactéries, mais fait partie d'un ensemble de réactions propres à l'organisme pour se défendre contre n'importe quel autre germe y compris peut-être les virus, et pour se débarrasser le plus vite possible de toute invasion microbienne*».

Em conclusão: graças à adesividade e à aglutinação as plaquetas interviriam de forma eficaz na defesa do organismo.

Durante experiências realizadas de colaboração com o Professor JORGE HORTA, sobre a distribuição do torotraste nos órgãos do Coelho, observei ao microscópio electrónico a presença de grânulos desta substância no interior de plaquetas dos capilares pulmonares. Este facto levou-me a admitir a capacidade das plaquetas de incorporarem no seu interior partículas estranhas, o que corresponde a demonstrar nestes elementos a propriedade fagocitária (DAVID-FERREIRA, 1960).

Na fig. 8 que representa uma plaqueta de coelho no interior de um capilar do pulmão, observam-se partículas de torotraste aderentes à membrana e outras no seio do hialómero no interior de pequenos tubulos ou de vacúolos.

Posteriormente, realizei experiências com plaquetas humanas isoladas e postas em contacto «*in vitro*» com partículas de dióxido de tório coloidal. Também nestes elementos se verificou intensa actividade fagocitária (DAVID-FERREIRA, 1961). As plaquetas que permaneceram mais tempo em contacto com o torotraste (1 hora) apresentavam numerosos vacúolos cheios desta substância. Na fig. 9, em que estão representadas porções de plaquetas humanas que foram postas em contacto «*in vitro*» com o torotraste, está representada não só a propriedade de incorporarem as partículas, como o provável mecanismo dessa incorporação.

Tanto experiências realizadas «*in vivo*», como as experiências «*in vitro*», põem pois em evidência a existência nas plaquetas de propriedade fagocitária.

Até agora a propriedade da fagocitose não fora demonstrada nas plaquetas dos mamíferos. Em 1896, CAJAL demonstrou nas células fusiformes do sangue da Rã grande poder fagocitário. Estas células, que segundo vários autores (JOLLY, 1923), correspondem às plaquetas do sangue dos mamíferos, são muito diferentes sob o ponto de vista morfológico, pois não só são muito maiores como possuem núcleo.

Em 1924 FIORITO realizou experiências «*in vitro*», em que investigou a propriedade fagocitária das plaquetas humanas em relação a várias bactérias. Concluiu não se observarem nas plaquetas quaisquer sinais de fagocitose.

Com o microscópio electrónico, mas utilizando ainda a técnica do estendimento e da metalização, BLOOM e colab. (1955) estudaram plaquetas humanas postas previamente em contacto com partículas de quartzo. Segundo estes autores, as partículas de quartzo aderem à superfície das plaquetas sobretudo na região do cromómero. Noutras experiências, verificaram no coelho que a injeção endovenosa de partículas de quartzo, era seguida de uma baixa do número de plaquetas do sangue circulante. Embora concluam serem os seus resultados pouco significativos, pois a instabilidade do número das plaquetas é muito grande no coelho, admitem a hipótese que após a injeção do quartzo houve destruição de plaquetas, provavelmente aquelas a que aderiram as partículas de quartzo. Nas experiências realizadas por BLOOM, GUSTAVSON e SWENSON (1955) é provável que também tenha havido incorporação de quartzo pelas plaquetas, mas como o método utilizado nesta época para observação das plaquetas ao microscópio electrónico (método do estendimento), não permitia verificar se as partículas se encontravam fora ou dentro da plaqueta, e como o conceito da adesividade era corrente, é natural que tenham pensado ser esta a propriedade que estava em jogo.

Nas experiências que realizámos com o torotraste tanto «*in vivo*» (plaquetas do coelho) como «*in vitro*» (plaquetas humanas), o facto de utilizarmos a técnica dos cortes finos,

permitiu verificar que as partículas de torotraste não só aderem à superfície das plaquetas como são incorporadas na própria plaqueta.

Recentemente DAXON, JERUSHALMY e DE VRIES (1959), observaram ao microscópio electrónico cortes de plaquetas anteriormente postas em contacto durante algum tempo com vírus da influenza. Algumas plaquetas, continham no interior de pequenos vacúolos partículas do vírus. Estes autores afirmam no final do seu trabalho, ignorar o mecanismo de entrada dos vírus no interior da plaqueta: «*The mechanism of incorporation of the virus particles into the platelets has not been elucidated*». Estamos certos que neste caso como nas nossas experiências com o torotraste as partículas do vírus foram incorporadas de uma forma activa pelas plaquetas.

A forma como é incorporado o torotraste nas plaquetas, demonstra a existência nestes elementos, de um mecanismo idêntico ao posto em evidência nalguns tipos celulares, a propósito da pinocitose e da fagocitose. Assim acontece na *Amoeba proteus* em que ANDRESEN e NILSSON (1960) demonstraram a formação de tubulos contendo o meio exterior após a indução da pinocitose pelo glutamato de sódio. Também nos macrófagos do pulmão KARRER (1960) pôs em evidência imagens idênticas a propósito da fagocitose da tinta da China. O mecanismo de incorporação do torotraste pelas plaquetas, constitui um bom exemplo das noções propostas por BENNETT (1956) sobre a incorporação de substâncias pela célula, o mecanismo de «*membrane flow*», que observámos sobretudo nas experiências «*in vivo*», e o mecanismo da «*membrane vesiculation*» observado sobretudo nas experiências «*in vitro*».

A actividade fagocitária das plaquetas, pode representar um papel importante na defesa do organismo devido ao grande número destes elementos em circulação. Se se admitir, que depois de terem incorporado partículas, as plaquetas se desintegram, poder-se-ão explicar trombopenias observadas em certas circunstâncias patológicas, como uma consequência da sua actividade fagocitária (DAVID-FERREIRA, 1960).

É por outro lado provável que plaquetas que tenham incorporado partículas de agentes patogénicos (vírus) se pos-

sam tornar agentes da sua propagação no nosso organismo.

Em resumo: A demonstração da actividade fagocitária nas plaquetas, constitui um facto cuja importância sob o ponto de vista fisiológico e fisiopatológico necessita larga exploração.

A propriedade fagocitária das plaquetas permite encarar sob um ângulo novo, alguns problemas relacionados com estes elementos sanguíneos. É provável que esta propriedade constitua uma base para explicar fenómenos a que PAGE se refere da seguinte forma:

«*This curious phenomenon of storage and release of pharmacologically active agents by platelets has as yet received no logical explanation. Indeed, knowledge of the phenomenon is at a very primitive stage and deserves more careful consideration by physiologists. These midget humoral packets called platelets must serve some function more useful than providing something for hematologists to count*».

Um conceito que se torna necessário rever é o da chamada «*atmosfera plasmática periplaquetária*». Segundo ROSKAM (1924) as plaquetas seriam envolvidas por uma camada de plasma que se encontra adsorvido à sua superfície. Para BOUNAMEAUX (1957) vários factores que intervêm na coagulação encontrar-se-iam localizados nesta atmosfera, pois só a realização de lavagens sucessivas permitiria a libertação completa dos factores adsorvidos pelas plaquetas.

Mais recentemente, SALMON (1960) realizou experiências em que demonstra, utilizando isotopos radioactivos e a técnica da imuno-electroforese, que «*les plaquettes humaines sont capables d'adsorber de façon tenace une protéine en présence de laquelle elles sont incubées*» e conclui afirmando que estas experiências «*apportent une nouvelle preuve en faveur de la notion selon laquelle l'atmosphère plasmatique periplaquetaire serait constituée de protéines adsorbées à la surface des thrombocytes*».

A existência da chamada «*atmosfera plasmática periplaquetária*», não teve qualquer espécie de confirmação nas observações morfológicas realizadas com o microscópio electrónico, mas pode acontecer que as técnicas utilizadas não a permitam pôr em evidência. Parece-nos porém, que embora se possa

admitir a sua existência, como explicação teórica para certos fenómenos, experiências como as realizadas por SALMON podem ter outra explicação.

A propriedade da fagocitose demonstrada com o torotraste põe em evidência que as plaquetas podem incorporar substâncias do meio exterior por fagocitose ou pinocitose. Tendo presente esta propriedade pode admitir-se que nas experiências realizadas por SALMON, a albumina marcada com iodo radioactivo, posta em contacto com as plaquetas durante duas horas a 37°C, foi incorporada por pinocitose o que explicaria a forma «tenace» com que estas proteínas se encontram ligadas às plaquetas.

As plaquetas são elementos vivos? — Um problema, que seguramente remonta aos primeiros trabalhos dedicados ao estudo das plaquetas, é o da discussão da sua vitalidade. As plaquetas são ou não elementos vivos?

Consideradas inicialmente por muitos, como fragmentos resultantes da destruição de outros elementos sanguíneos, a sua vitalidade assim como a sua autonomia, foram postas em dúvida desde os primeiros trabalhos.

Demonstrada a sua independência dos outros elementos sanguíneos e esclarecida a sua origem, o problema da sua vitalidade continuou a ser posto, pois podia admitir-se serem simples fragmentos celulares cujas propriedades resultavam, não de uma actividade vital, mas dos produtos que continham. Para alguns ainda, as plaquetas seriam verdadeiras células em que o granulómero representaria o núcleo. Posto de lado o seu carácter celular, uma vez que se demonstrou que se formam por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, o problema adquiriu uma nova forma: Apesar de fragmentos celulares as plaquetas são ou não elementos com vida?

MAUPIN, que analisou os argumentos susceptíveis de esclarecerem o problema, concluiu que dois argumentos falam da sua natureza:

a — a sua mobilidade demonstrada por microcinematografia (BESSIS e BRICKA, 1952).

b — a demonstração de fenómenos respiratórios e metabólicos em plaquetas isoladas «*in vitro*».

A estes argumentos acrescentamos agora a sua actividade fagocitária. De facto as plaquetas comportam-se como os organismos celulares que privados experimentalmente de núcleo conservam durante algum tempo mobilidade e poder fagocitário.

A demonstração da propriedade fagocitária é pois mais um argumento a favor dos que pensavam com FIRKET serem estes elementos: «*vivants, quoique non cellulaires*».

A ORIGEM E A MORTE DAS PLAQUETAS

Apesar dos trabalhos iniciais de BIZZOZERO que as interpretava como elementos independentes do sangue, as plaquetas foram durante algum tempo consideradas produtos de destruição dos glóbulos vermelhos ou dos glóbulos brancos. Estas hipóteses contribuíram para que vários autores pusessem em dúvida a sua existência no sangue como elementos autónomos.

Em 1906 WRIGHT, admite pela primeira vez, a formação das plaquetas sanguíneas, a partir dos megacariócitos da medula óssea. Esta hipótese é classificada por CAJAL de audaz pois que, como faz notar PERRONCITO, «*cuanto sabemos de la ontogenia de los tejidos, no muestra un solo hecho bien establecido de celula, en cuyo protoplasma se engendram elementos anucleados, absolutamente diferentes en morfologia estructura y actividade fisiologica del elemento anatomico progenitor*». Como todas as hipóteses «audazes» encontrou opositores e defensores apaixonados.

A opinião de WRIGHT, que se baseava inicialmente na semelhança da constituição do citoplasma dos megacariócitos e das plaquetas e em imagens de expulsão de porções dos megacariócitos no interior dos vasos (*imagens de WRIGHT*), adquiriu progressivamente novos argumentos e mais defensores. A fórmula de FRAXCK: «*Le géant de la moelle osseuse engendre le nain du sang*» acabou por traduzir a opinião da maioria.

Apesar disso ainda em 1954 BESSIS escreve no seu tratado de citologia sanguínea: «*Il faut cependant ne pas oublier*

que, par le moment personne n'a encore vu d'une manière indiscutable des thrombocytes se détachant in vivo du cytoplasma des mégacaryocytes».

Em 1956 THIERY e BESSIS filmaram ao microscópio de contraste de fase a formação das plaquetas a partir dos megacariócitos. As observações com o microscópio electrónico como veremos neste capítulo constituem mais uma demonstração da teoria de WRIGHT, e dão ao estudo do mecanismo da plaquetogénese uma nova contribuição.

A ultraestrutura dos megacariócitos — Os megacariócitos da medula óssea são células que têm geralmente 40 a 60 μ de diâmetro, mas que podem chegar a atingir cerca de 100 μ . A designação que também se lhes dá, de células gigantes da medula óssea está pois perfeitamente justificada. Ao microscópio óptico observam-se com muita frequência nos cortes de medula óssea de animais jovens. O seu núcleo, muito volumoso, é irregular pois tem numerosos lobos de tamanho muito diverso. No citoplasma vêm-se abundantes granulações azurófilas, que formam algumas vezes pequenos agrupamentos separados por substância fundamental. Com frequência observa-se à volta do núcleo uma zona sem granulações com aspecto de um halo perinuclear.

A ultraestrutura dos megacariócitos foi estudada ao microscópio electrónico por vários autores que não só descreveram os aspectos fundamentais da morfologia destes elementos, como analisaram o problema da formação das plaquetas (PEASE, 1955 e 1956; YAMADA, 1957; OLIVER, 1960; SCHULZ, 1960).

Nos cortes finos de medula óssea os megacariócitos reconhecem-se com facilidade (Fig. 10). As suas dimensões, o aspecto do seu núcleo e do citoplasma tornam simples a sua identificação ao microscópio electrónico. De forma variável, mas geralmente redonda ou ovalar os megacariócitos são limitados por uma membrana e o seu contorno apresenta irregularidades com o aspecto de pequenos pseudópodos.

O núcleo dos megacariócitos é grande, muito irregular e está geralmente situado na porção central da célula. Têm numerosos lóbulos que pelo seu carácter muito sinuoso aparecem em muitos cortes finos como porções independentes.

No seu interior observam-se vários pequenos nucléolos (Fig. 10).

No citoplasma identificam-se geralmente duas zonas principais, uma perinuclear granulosa em que se encontram dispersas algumas mitocôndrias, e outra periférica que está dividida por numerosos sistemas de duplas membranas (Fig. 10 e 11). Nesta zona periférica, são abundantes pequenas granulações, sem dúvida correspondentes às granulações azurófilas observadas com o microscópio óptico, e cuja estrutura é idêntica à das granulações α observadas nas plaquetas.

A zona citoplásmica perinuclear é formada por uma substância fundamental homogênea na qual se observam pequenas mitocôndrias, grãos de Palade, alguns mas escassos sistemas de duplas membranas desprovidos de grânulos e ainda grânulos, que ao contrário das granulações azurófilas, são rodeados por uma membrana limitante e dentro dos quais excêntricamente se encontra um grânulo denso.

Na zona perinuclear está situado o aparelho de Golgi que de acordo com a opinião de JONES (1960) é onde se formam os grânulos precursores das granulações azurófilas.

Segundo YAMADA (1957) a descrição de diferentes zonas no citoplasma dos megacariócitos foi feita pela primeira vez por HEIDENHAIN em 1894. Este autor identificou no citoplasma dos megacariócitos três zonas: uma interna perinuclear, uma média geralmente mais larga que é ocupada pelos sistemas de membranas e uma zona externa imediatamente abaixo da membrana celular. A descrição de HEIDENHAIN foi confirmada pelas observações de YAMADA (1957) com o microscópio electrónico.

Também com frequência reconhecemos no citoplasma dos megacariócitos as três zonas descritas por este autor, acontece porém, que a zona periférica que é mais estreita, falta com muita frequência.

Conforme foi assinalado por vários autores ao microscópio óptico (CHAVES, 1935), observam-se com frequência no interior dos megacariócitos outras células sanguíneas. Este facto foi ponto de partida para a defesa de que os megacariócitos têm funções fagocitárias. Num corte que observámos ao microscópio electrónico identificámos um megacariócito con-

tendo no seu interior um eosinófilo (Fig. 11). A estrutura de ambas as células encontrava-se perfeitamente bem conservada. Provavelmente o eosinófilo foi envolvido pelo megacariócito não se tratando de uma verdadeira fagocitose (CHAVES 1935).

Nas experiências que realizámos no Coelho e no Ratinho com o torotraste, os megacariócitos só raramente e em muita pequena quantidade continham no seu interior pequenos agrupamentos de partículas de torotraste. Não se manifesta portanto nestas células, pelo menos com a exuberância com que se vê nas plaquetas, a propriedade da fagocitose. Mesmo que os megacariócitos incorporem pequenas quantidades de torotraste não se lhes pode atribuir o carácter de fagócitos.

A formação das plaquetas — Para YAMADA (1957) a primeira manifestação da formação das plaquetas pelos megacariócitos é o aparecimento no citoplasma destas células de numerosas vesículas com 400 Å de diâmetro (*platelet demarcation vesicles*). Posteriormente estas vesículas fundem-se e constituem tubulos (*platelet demarcation tubules*) que crescem e dividem o citoplasma em pequenos territórios que vão originar as plaquetas.

Na zona periférica do citoplasma do megacariócito, observam-se como vimos, numerosos sistemas de duplas membranas que dividem a sua substância fundamental em pequenos territórios. Estes sistemas de duplas membranas são interrompidos nalguns pontos, pelo que a demarcação destes territórios é incompleta. Na substância fundamental homogênea ou finamente granulosa observam-se alguns grãos de Palade, pequenas mitocôndrias, algumas microvesículas e granulações idênticas aos grânulos α das plaquetas.

Os sistemas de membranas de que a zona periférica dos megacariócitos é tão rica, constituem a base para a explicação do mecanismo da formação das plaquetas. Do seu crescimento, de que resulta inicialmente a separação incompleta de pequenos territórios no citoplasma dos megacariócitos, acaba por resultar a completa separação desses territórios e a formação das plaquetas sanguíneas. Na fig. 12 que constitui um documento particularmente feliz, vê-se uma plaqueta que

acaba de formar-se a separar-se do megacariócito precursor. Como os megacariócitos estão geralmente situados junto dos capilares, as plaquetas que se libertam entram em circulação.

O problema da plaquetogénese encontrou na microscopia electrónica uma excelente base para o esclarecimento do seu mecanismo, mas o fundo do problema continua por resolver. Qual o determinismo que comanda a transformação do citoplasma dos megacariócitos nos inúmeros territórios que vão dar as plaquetas? O que determina a aproximação certamente activa destas células dos capilares sanguíneos onde como que segregam porções do seu citoplasma?

Em Biologia, é frequente não se conhecer o determinismo de muitos fenómenos e por essa razão os dizemos «estranhos». No caso da plaquetogénese o fenómeno é estranho não só porque não lhe conhecemos o determinismo, mas por ser um fenómeno inabitual. Não tinha razão PERRONCITO quanto às suas dúvidas sobre a intervenção dos megacariócitos na génese das plaquetas, mas a razão das suas dúvidas continua por esclarecer. Porque é que estas células se comportam de uma forma tão original?

A morte das plaquetas — De acordo com determinações realizadas por vários métodos (MAUPIN, 1957), a vida das plaquetas tem uma duração de 5 a 9 dias.

Como e onde são destruídas as plaquetas, ou os seus restos, depois de utilizadas na formação de trombos, após aglutinação a ainda depois de fenómenos de fagocitose como os que descrevemos?

O mecanismo de destruição das plaquetas não foi ainda descrito de forma precisa. Admite-se, mas as provas não são completas, que o sistema retículo-endotelial exerce uma função importante na recolha destes elementos da corrente sanguínea. O baço teria segundo alguns autores uma função primordial na sua destruição (MAUPIN, 1954).

Nas experiências realizadas no Coelho, observámos que no baço dos animais injectados com torotraste, se podem observar com facilidade plaquetas parcialmente destruídas, contendo partículas daquela substância. Embora também no pulmão e no fígado, se observem algumas plaquetas contendo

torotraste parcialmente destruídas, o grande número de formas nitidamente alteradas observou-se sempre no baço.

Nunca vimos ou identificámos a fagocitose destes elementos pelos macrófagos, que de forma geral se encontravam muito carregados de torotraste. É provável que numa experiência conduzida de forma diferente, isto é, em vez de injectar torotraste, injectar plaquetas que previamente tenham fagocitado torotraste, seja possível localizar as regiões em que estes elementos são fagocitados.

Pelo momento, à luz das nossas observações, consideramos com MAUPIN (1954): «*très probable l'intervention de la rate dans l'élimination des plaquettes vieillies, mais elle n'est certainement pas exclusive*».

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

1 — As plaquetas sanguíneas são limitadas por uma membrana de 78 Å cuja ultraestrutura é idêntica às membranas celulares. De acordo com as experiências realizadas com o torotraste (DAVID-FERREIRA, 1960 e 1961) esta membrana tem algumas propriedades fisiológicas semelhantes (fagocitose, pinocitose).

2 — O hialómero das plaquetas tem densidade variável. Algumas plaquetas estão como que vazias da substância fundamental (*plaquetas «claras»*). Nestes elementos a membrana tem contornos mais regulares do que é habitual, não se observando pseudópodos. Este aspecto, talvez corresponda a ausência de mobilidade. As *plaquetas «claras»* são provavelmente elementos em vias de degenerescência.

3 — No hialómero estão dispersos os grânulos e vacúolos que constituem o granulômero, e que se classificam em quatro grupos: α , β , γ e δ . Segundo as nossas observações:

a — Parte dos tubulos e vacúolos que constituem o granulômero γ resultam de fenómenos de pinocitose.

b — O granulômero δ pode resultar de fenómenos de incorporação realizados pelas plaquetas.

4 — Os *grânulos em baqueta de tambor* descritos em plaquetas do sangue de doentes com a trombopatia de WILLEBRANDT-JÜRGENS e interpretados por SCHULZ e colab. (1958) como característicos desta doença observam-se em plaquetas de indivíduos normais.

5 — Nas plaquetas humanas normais «*in vitro*», identificámos grânulos de 200 Å que a coloração pelo acetato de uranilo torna muito evidentes. Num trabalho em publicação (DAVID-FERREIRA e DAVID-FERREIRA, 1962) demonstra-se que estes grânulos representam o substracto morfológico do gliogénio das plaquetas.

6 — Propomos a introdução na classificação dos elementos do granulômero de mais um grupo: o *granulômero ϵ (épsilon)* constituído por grânulos densos de dimensões inferiores a 300 Å. Fazem parte deste grupo os grânulos de «*liberalisierte α -Substanz*» descritos por SCHULZ (1960) e os grânulos de 180 a 200 Å descritos neste trabalho.

Os grânulos em baqueta de tambor de aspecto semelhantes aos grânulos α devem ser considerados como fazendo parte do granulômero α .

7 — Conforme foi demonstrado (DAVID-FERREIRA, 1960) as plaquetas podem fagocitar substâncias introduzidas na circulação, esta propriedade pode ter importância na defesa do organismo mas também no caso de fagocitose de agentes patogénicos (virus) na propagação destes agentes.

8 — No presente trabalho concluiu-se que fenómenos para cuja explicação é admitida a existência de uma «*atmosfera plasmática periplaquetária*» podem ser explicados pela actividade fagocitária das plaquetas. Experiências como as de SALMON (1958 e 1960), em que se conclui que as plaquetas absorvem de forma «*tenaz*» na sua superfície proteínas com

que são incubadas, podem interpretar-se admitindo que as plaquetas incorporam por pinocitose ou fagocitose essas proteínas. O transporte de substâncias pelas plaquetas pode-se explicar pelo mesmo mecanismo.

9 — A propriedade fagocitária das plaquetas pode ser utilizada como teste de vitalidade no estudo destes elementos.

10 — Conforme foi pela primeira vez descrito por YAMADA (1957), as plaquetas formam-se a partir dos megacariócitos, por um mecanismo de fragmentação do seu citoplasma que resulta do crescimento de sistemas de membranas intracitoplásmicas.

11 — De acordo com observações realizadas no baço de animais injectados com torotraste deste órgão é um dos locais da sua destruição.

12 — É provável que da destruição das plaquetas que incorporam substâncias estranhas resultem trombopénias (trombopénias de causa periférica).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1 — The blood platelets are surrounded by a membrane of 78 Å which ultrastructure is identical to the cell membranes.

According to our experiments (DAVID-FERREIRA 1960, 1961) this membrane has some identical properties (*pinocytosis*, *phagocytosis*).

2 — The density of the platelet hyalomere is variable, some platelets appear empty (*clear platelets*) (Fig. 1 and 2) the outline of the clear platelets is very regular and have no pseudopods. This aspect may be caused by the absence of

mobility. The clear platelets are probably degenerating elements.

3 — In the hyalomere are dispersed the granules and the vesicles which form the granulomere. These elements are classified in four groups: α , β , γ and δ (Fig. 3).

The following was observed:

a — The tubules and the vesicles of the γ granulomere are the result of pinocytotic activity of the platelets.

b — The δ granules may be a result of phagocytosis.

4 — In the platelets of patients with thrombopathia of WILLEBRANDT-JÜRGENS, SCHULZ and coll. (1958) described a special type of granules: the *drum-stick granules* (*«Trommelschlegelgranula»*).

These authors interpret the drum-stick granules as characteristics of the platelets of this disease. In the present work are described similar granules in human platelets providing from normal healthy subjects (Fig. 4).

5 — In the normal human blood platelets are described granules of small dimensions (180 to 200 Å) which are more evident after staining with uranyl acetate (Figs. 5, 6 and 7). It is demonstrated in an article now in press (DAVID-FERREIRA e DAVID-FERREIRA, 1962) that these granules are glycogen.

6 — The introduction of a new group in the classification of the platelet granulomere is proposed. This group, the *ε granulomere*, is formed by dense granules with a diameter below 300 Å. The granules of the *«liberalisierte α-Substanz»* described by SCHULZ (1960) and the granules of 200 Å described in this work are components of this group.

7 — According to the experiments realized with the thorotrast (DAVID-FERREIRA, 1960) the platelets are able to phagocytize substances introduced into the circulation (Fig. 8). Probably this property is important in the defense of the organism. Thus it is possible where pathogenic agents are

phagocytized, that the blood platelets may be elements dissemination of these agents.

8 — In the present work it is concluded that the concept of a «periplaetelet plasmatic atmosphere» is not necessary for the explanation of several phenomenons. Recently SALMON (1958, 1960) admitted the existence of the «periplaetelet plasmatic atmosphere» to explain that the platelets adsorb the proteins which have been incubated. We can explain these experiments by the phagocytic properties of the platelets.

9 — It is possible to employ the phagocytic activity of the platelets as a test of vitality of these elements.

10 — Our observations on the bone marrow (Figs. 10, 11 and 12) agree with the conclusions of YAMADA (1957) that the platelets are formed by the fragmentation of the megacaryocytes, which result in the development of intracytoplasmic membranes.

11 — Observations on the spleen of animals injected with thorotrast are in agreement with the concept that the spleen is a destroying organ of the platelets.

12 — The destruction of the platelets after phagocytosis could explain some thrombocytopenias.

BIBLIOGRAFIA

ANDRESEN, C. C., & NILSSON, J. R.

1960 Electron micrographs of pinocytosis channels in *Amoeba proteus*. *Exp. Cell Res.* **19**: 631-633.

BENNETT, H. S.

1956 The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping. *J. Biophys. and Biochem. Cytology.* **2**: Suppl., 99-103.

BERNHARD, W. & LEPLUS, R.

1954 La méthode des coupes ultrafines et son application à l'étude de l'ultrastructure des cellules sanguines. *J. Suisse Med.* **85**: 897-907.

BESSIS, M.

1954 Traité de Cytologie Sanguine. Masson & Co. Paris.

BESSIS, M. & BRICKA

1952 Aspect dynamique des cellules du sang. Son étude par la microcinématographie en contraste de phase. *Rev. Hématol.* **7**: 407-435.

BLOOM, G.

1954 The disintegration of human blood platelets after taking up fine quartz particles. *Z. Zellforsch.* **40**: 222-227.

BLOOM, G., GUSTAVSON, K. H. & SWENSSON, A.

1955 On the reaction of the thrombocytes to submicroscopic particles in vitro. *Acta haemat. (Basel)* **13**: 57-63.

BOUNAMEAUX, Y.

1957 Dosage des facteurs de coagulation contenus dans l'atmosphère plasmatique des plaquettes humaines. *Rev. franç. Études clin. et biol.* **2**: 52.

BRACCO, M. & CURTI, P. C.

1954 The vaso-constrictor factor of platelets. *Experientia.* **10**: 71-72.

CAJAL, S. R.

1896 Sobre la fagocitosis de las plaquetas. *Rev. Micrografica* **1**: 31-37.

CHAVES, R.

1935 As células gigantes da medula óssea. *Medicina (Lisboa)*: 3-22.

COPLEY, A. L. & BALÉA, T.

1960 L'importance des plaquettes et des capillaires sanguines dans les états initiaux de la tuberculose des mammifères. *Path. et Biol.* **8**: 1137-1146.

DANON, D., JERUSHALMY, Z. & DE VRIES, A.

1959 Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. *Virology*, **9**: 719-722.

DAVID-FERREIRA, J. F.

1960 Démonstration du pouvoir phagocytaire des plaquettes sanguines chez le lapin. *Proc. European Regional Conf. Electr. Micr. (Delft)* **2**: 917-920.

DAVID-FERREIRA, J. F.

1961 Sur la structure et le pouvoir phagocytaire des plaquettes sanguines. *Z. Zellforsch.* **55**: 89-103.

DAVID-FERREIRA, J. F. & DAVID-FERREIRA, K.

1962 L'ultrastructure des plaquettes sanguines. *Z. Zellforsch.* (in press).

FEISSLY, R., GAUTHIER, A. & MARCOVICI, I.

1958 Étude au microscope électronique des modifications morphologiques des plaquettes dans le sang conservé. *Proc. of VII Congress of the Int. Soc. of Blood Transfusion, (Rome)* pg. 931-935.

- FEISSLY, R., GAUTHIER, A. & MARCOVICI, I.
1960 L'ultrastructure des thrombocytes du sang humain normal. *Proc. 4th. Internat. Conf. Electr. Micr.* 2: 261-263 Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- FIORITO, G.
1924 La fagocitosi delle piastrine. *Haematologica*, 5: 390-394.
- GIESEKING, R.
1958 Aufnahme und Ablagerung von Fremdstoffen in der Lunge nach elektronen-optischen Untersuchungen. *Ergebn. Allg. Path. path. Anat.* 38: 92-126.
- HARDISTY, R. M. & STACEY, R. S.
1955 5-Hydroxytryptamine in normal human platelets. *J. Physiol.*, 130: 711-720.
- HUMPHREY, J. H. & JAKES, R.
1954 The histamine and serotonin content of the platelets and polymorphonuclear leucocytes of various species. *J. Physiol.*, 124: 305-310.
- JOLLY, J.
1923 *Traité Technique d'Hématologie*. A. Maloine et fils. Paris.
- JONES, O. P.
1960 Origin of Megakaryocyte granules from Golgi vesicles. *Anat. Rec.* 138: 105-114.
- KARRER, H. E.
1960 Electron microscopic study of the phagocytosis process in lung. *J. biophys. biochem. cytol.* 7: 357-366.
- KÖPPEL, G.
1958 E. m. Untersuchungen zur Funktionsmorphologie der Thrombozyten und zum Gerinnungsablauf im normalen menschlichen Nativblut. I. Frühe Veränderungen der Thrombozyten. *Z. Zellforsch.* 47: 401-439.
- MARCOVICI, J. & GAUTHIER, A.
1959 Liste analytique des travaux de cytologie électronique traitant de l'ultrastructure des thrombocytes. *Haematologica (Pavia)* 44: 275-292.
- MAUPIN, B.
1954 *Les plaquettes sanguines de l'homme*. Masson & Cie. Paris.
- MAUPIN, B.
1957 Durée de vie des plaquettes. *Rev. Franç. Et. Clin. et Biol.* 2: 72-80.
- PAGE, I. R.
1954 Serotonin (5-hydroxytryptamine). *Phys. Rev.* 34: 563-588.
- PAGE, I. R.
1958 Serotonin (5-hydroxytryptamine); the last four years. *Phys. Rev.* 38: 277-335.
- PEASE, D.
1956 An electron microscopic study of red bone marrow. *Blood* 11: 501-526.

- POLICARD, A., COLLET, A. & GILTAIRE-RALYTE, L.
1955 Étude au microscope électronique de thrombi plaquettaires formés dans les capillaires pulmonaires au cours d'agressions expérimentales par des particules inframicroscopiques de silice. *Bull. Micr. appl.* 5: 7-8.
- POLICARD, A., COLLET, A. & PRÉGERMAIN, S.
1959 Étude infrastructurale des thrombocytes du sang circulant chez le Rat. *Bull. Micr. appl.* 9: 26-29.
- RAND, M. & REID, G.
1951 Source of serotonin in serum. *Nature*, 168: 385.
- RINEHART, J. F.
1955 Electron microscope studies of sectioned white blood cells and platelets. *Amer. J. Clin. Path.* 25: 605-619.
- ROSKAM, J.
1923 Contribution à l'étude de la physiologie normale et pathologique du globulin (plaquette de Bizzozero). *Arch. internat. physiol.*, 20: 241.
- SALMON, L.
1960 Absorption of proteins by blood platelets. *Experientia* 16: 26-27.
- SALMON, J.
1953 Recherches immunologiques sur l'existence d'une atmosphère plasmatique entourant les plaquettes humaines. *Proc. of VII th. International Congress of the Int. Soc. of Hemat.* 2: 1-9. (Rome).
- SCHULZ, H.
1957 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lunge des Siebenschlafers nach Hibernation. *Z. Zellforsch.* 46: 583-597.
- SCHULZ, H. & HIEPLER, E.
1959 Über die Lokalisierung von gerinnungsphysiologischen Aktivitäten in submikroskopischen Strukturen der Thrombocyten. *Klin. Wschr.* 37: 273-285.
- SCHULZ, H., JÜRGENS, R. & HIEPLER, E.
1958 Die Ultrastruktur der Thrombozyten bei der konstitutionellen Thrombopathie (V. Willebrandt-Jürgens) mit einem Beitrag zur submikroskopischen Orthologie der Thrombozyten. *Thromb. Diat. haem.* 2: 300-323.
- SUEYASU, T. & TAGESHIGE, Y.
1956 Electron microscopic study on the blood platelets of the rabbit. *Kurume med. J.*, 3: 114-128.
- THIFRY, J. P. & BESSIS, M.
1956 Mécanisme de la plaquetogénèse. Étude «in vitro» par la microcinématographie. *Rev. Hémat.* 11: 162-174.
- UNDENFRIEND, S. & WEISSBACH, H.
1954 Studies on serotonin (5-hydroxytryptamine) in platelets. *Fed. Proc.* 13: 412.

WATSON, M. L.

1928 Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J biophys, biochem cytol.* **4**: 475-478.

WOLPERS, C. & RUSKA, H.

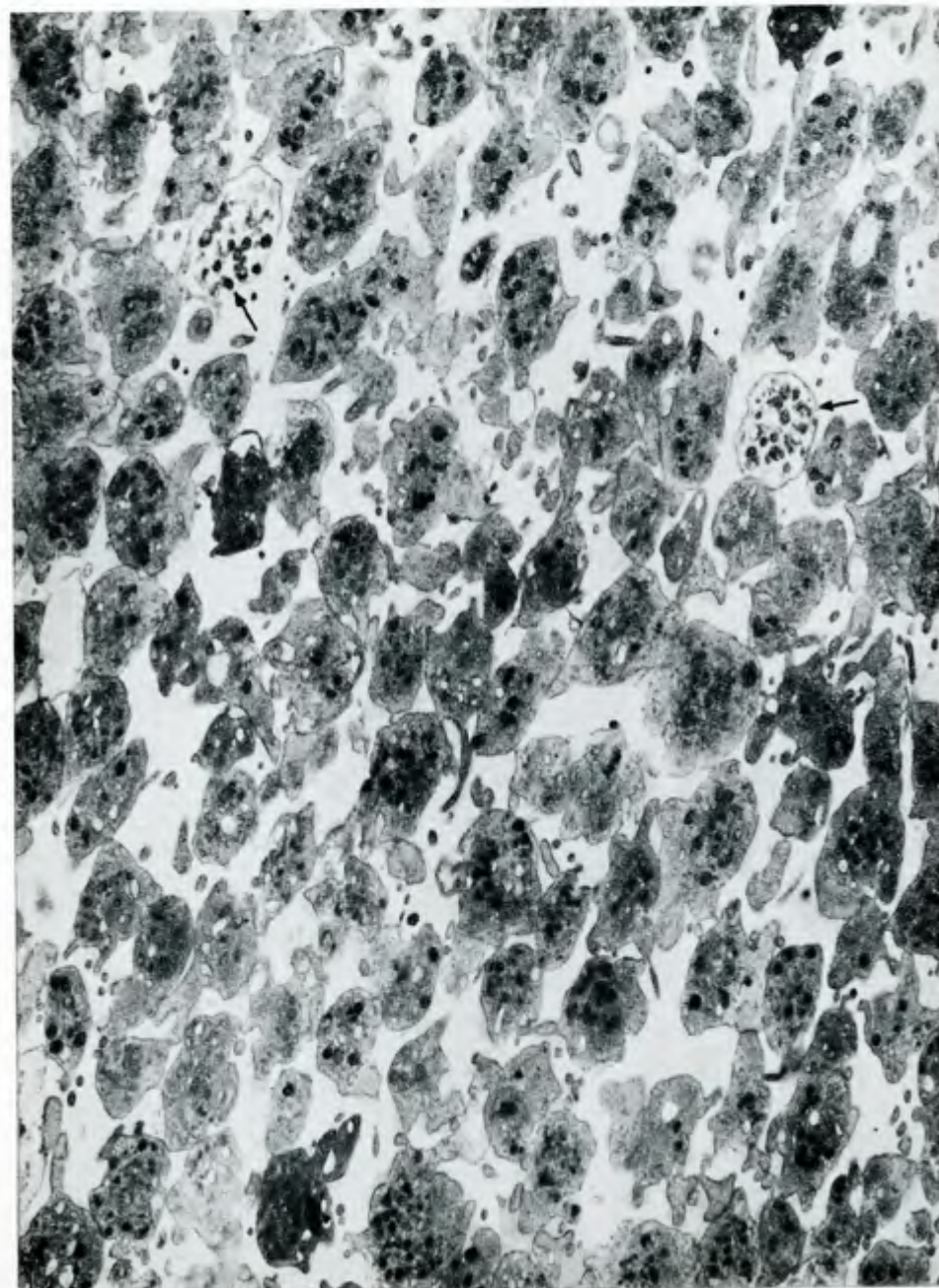
1939 Strukturuntersuchungen zur Blutgerinnung. *Klin. Wschr.* **18**: 1077-1081.

YAMADA, E.

1957 The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat.* **29**: 267-290.

ZUCKER, M. B.

1951 Release of vasoconstrictor substance from platelets *Fred. Proc.* **10**: 151.



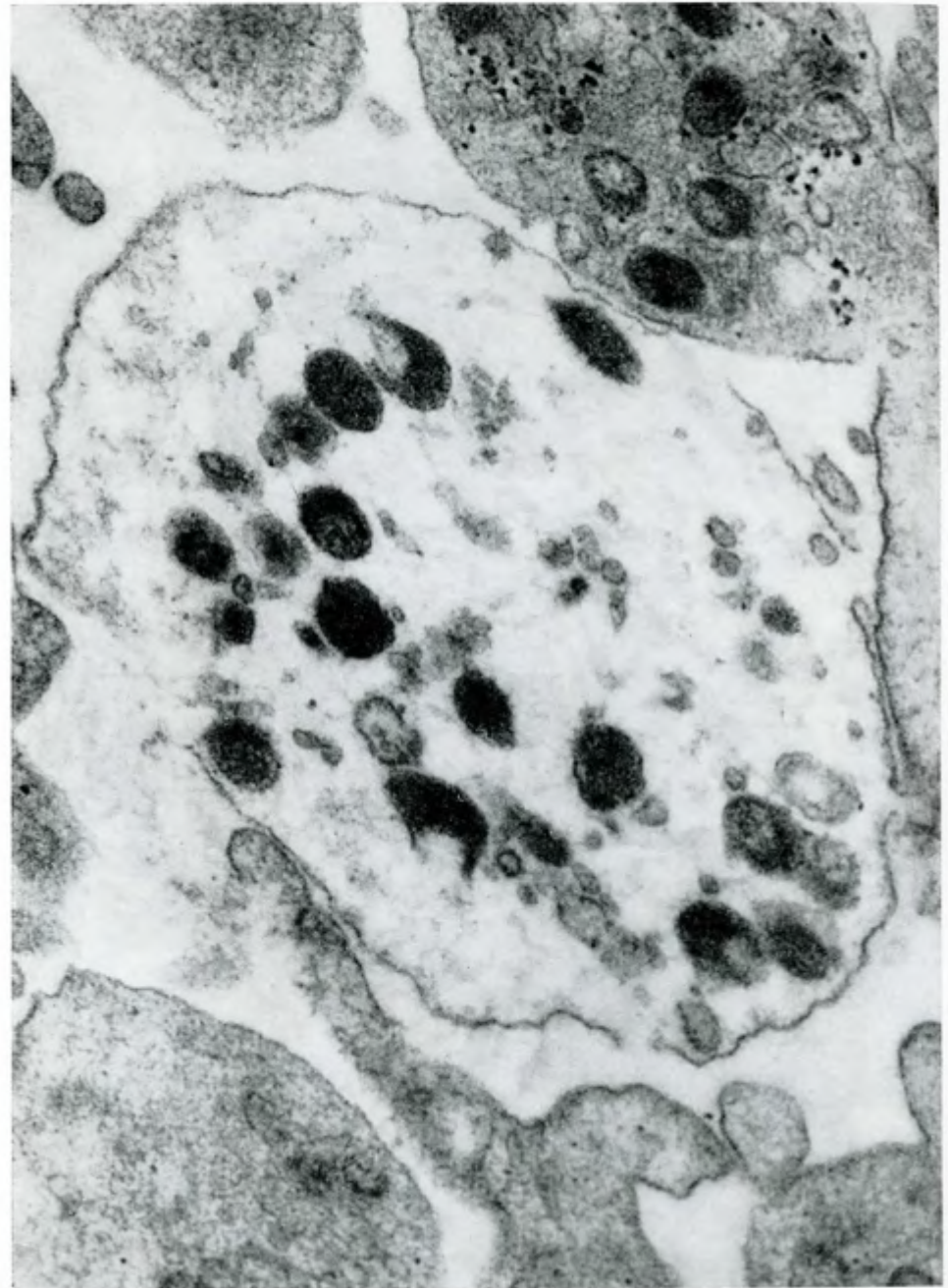


Fig. 9. *Plasmodium humanum*.

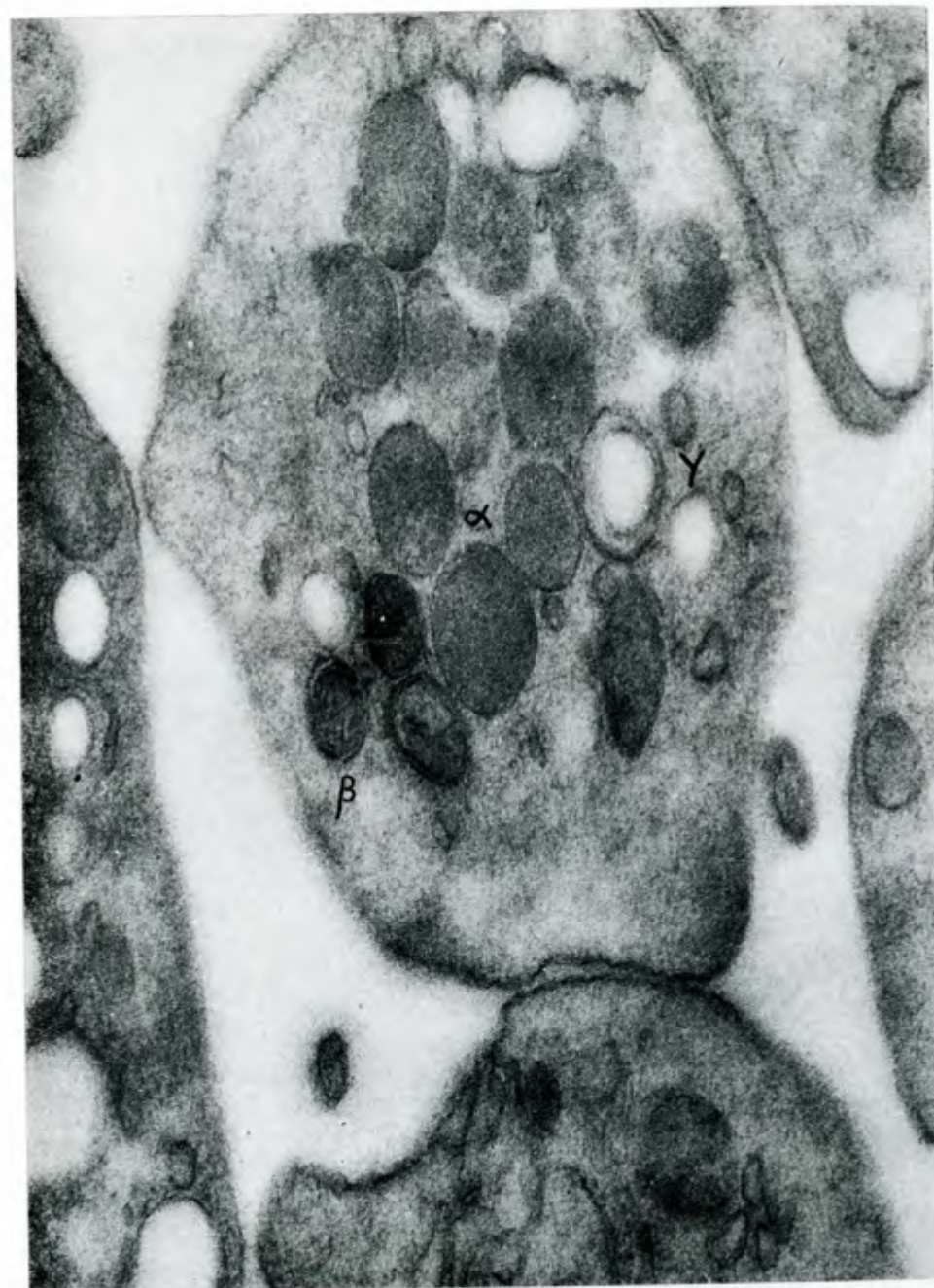
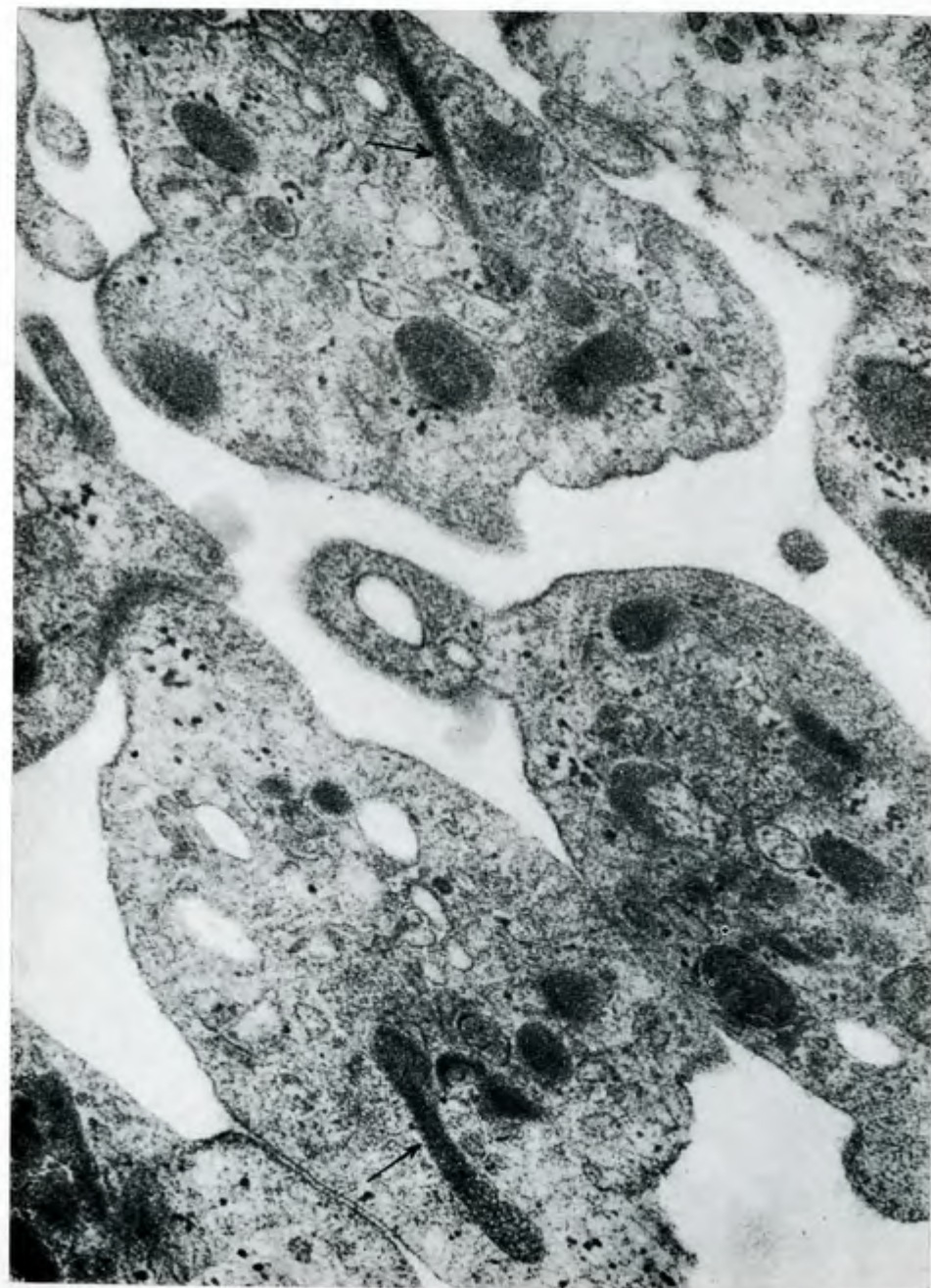


Fig. 3 — *Plaquetas humanas normais.*

ESTAMPA XVIII



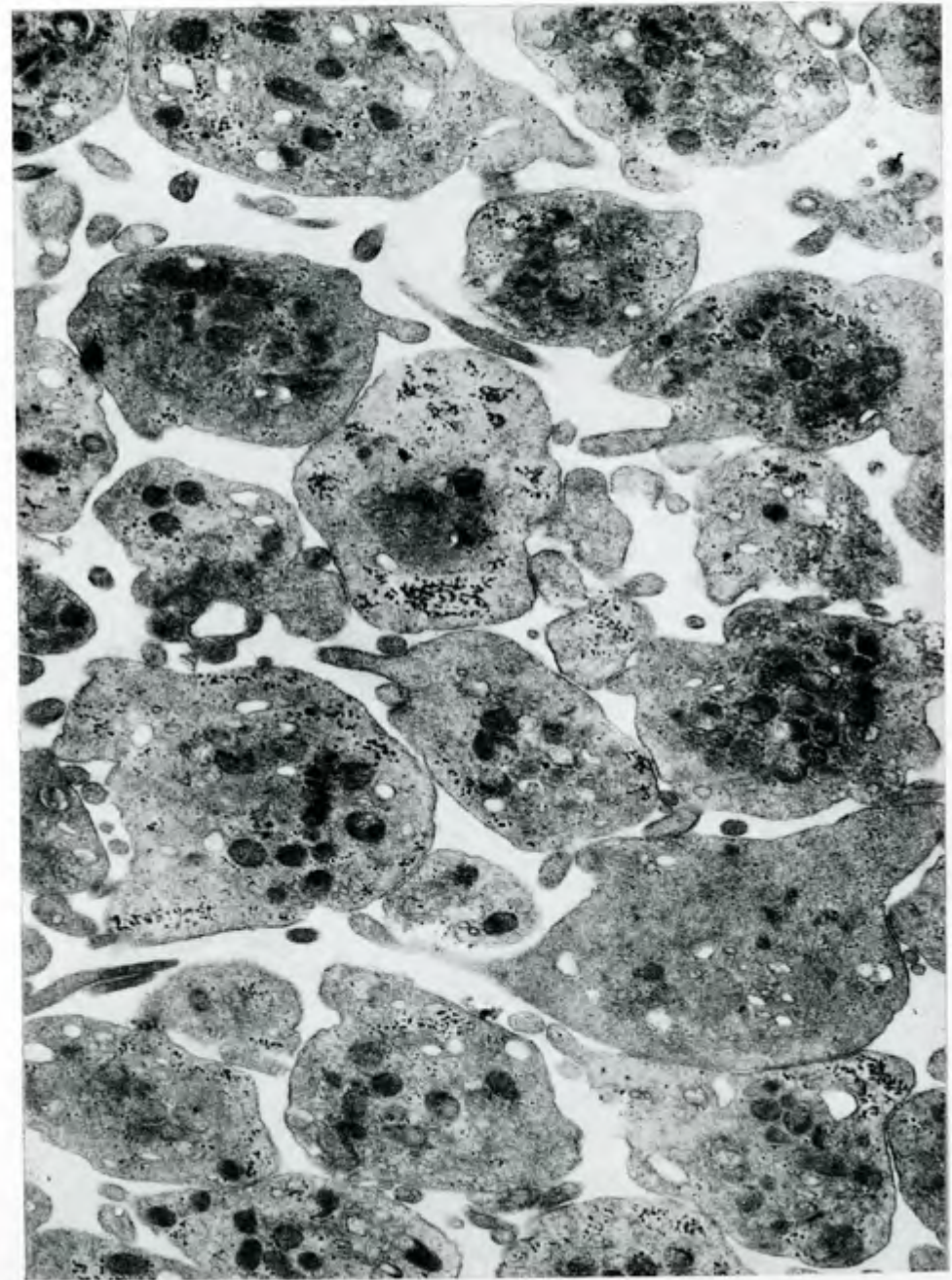


Fig. 5 — *Plaquetas humanas normais.*

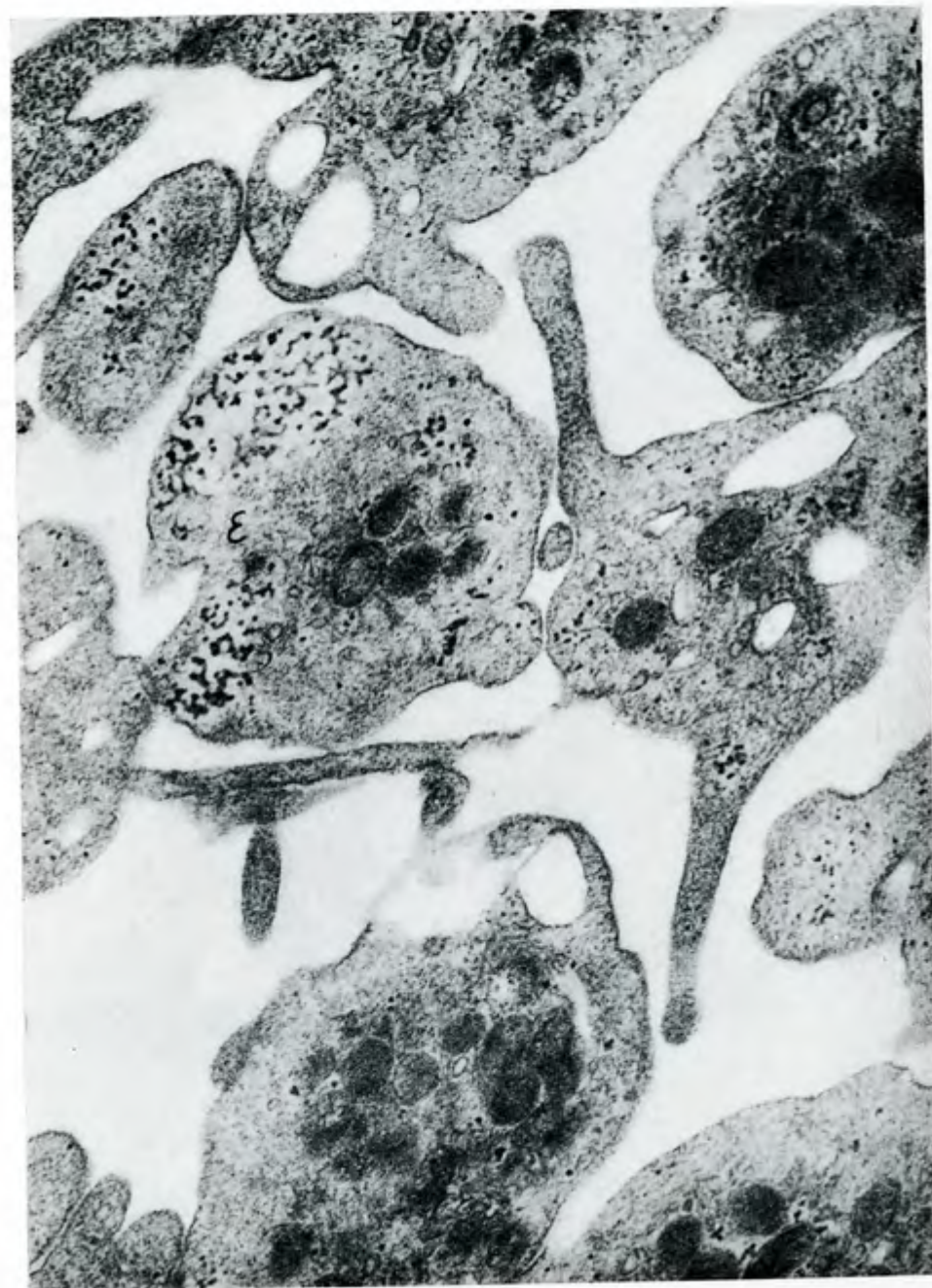


Fig. 6 — *Plasmetas humanas normais.*



Fig. 7 — *Plaquetas humanas normais.*

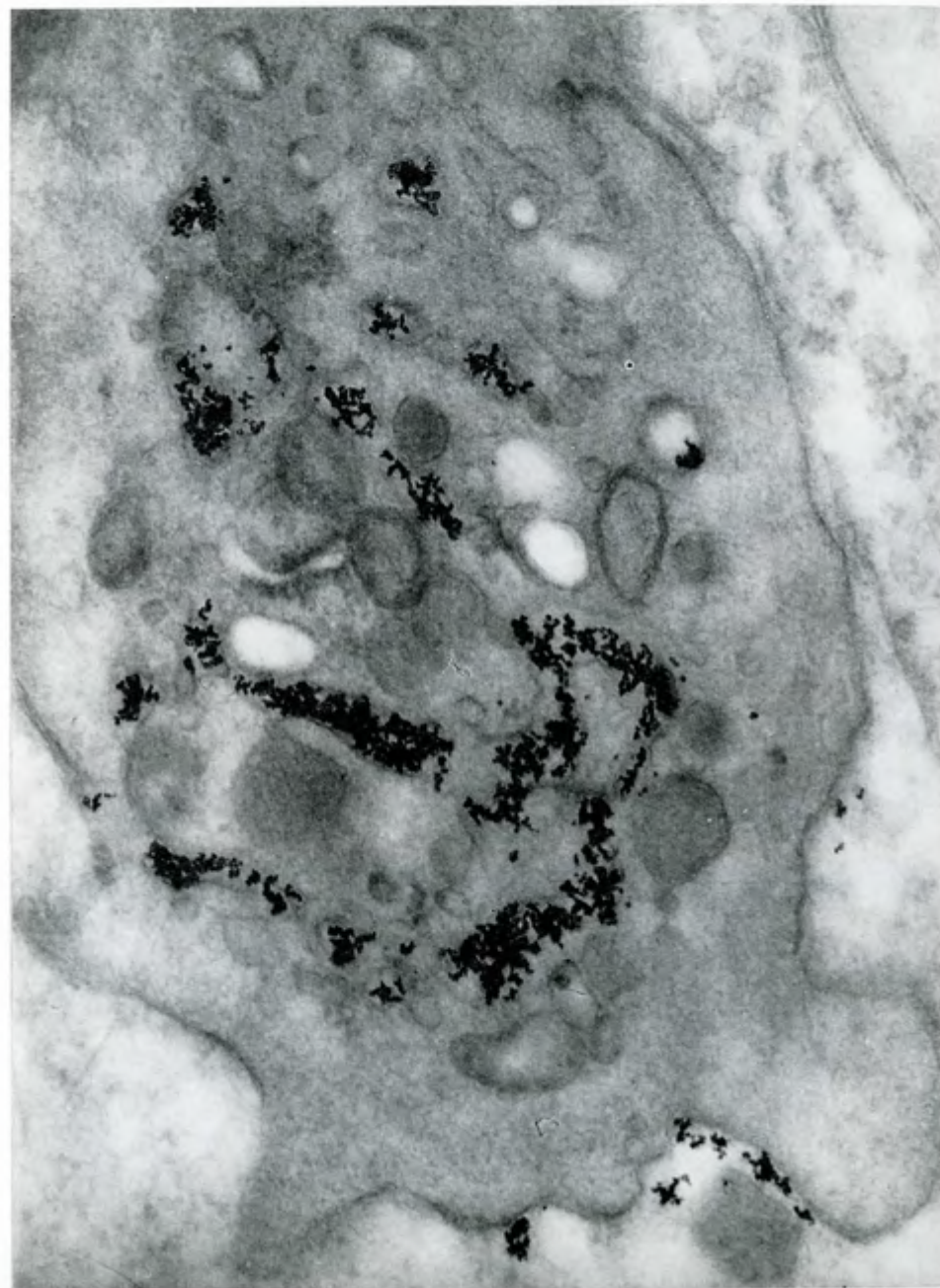


Fig. 8 — *Plaquetas sanguínea observada no interior de um capilar do pulmão de um*

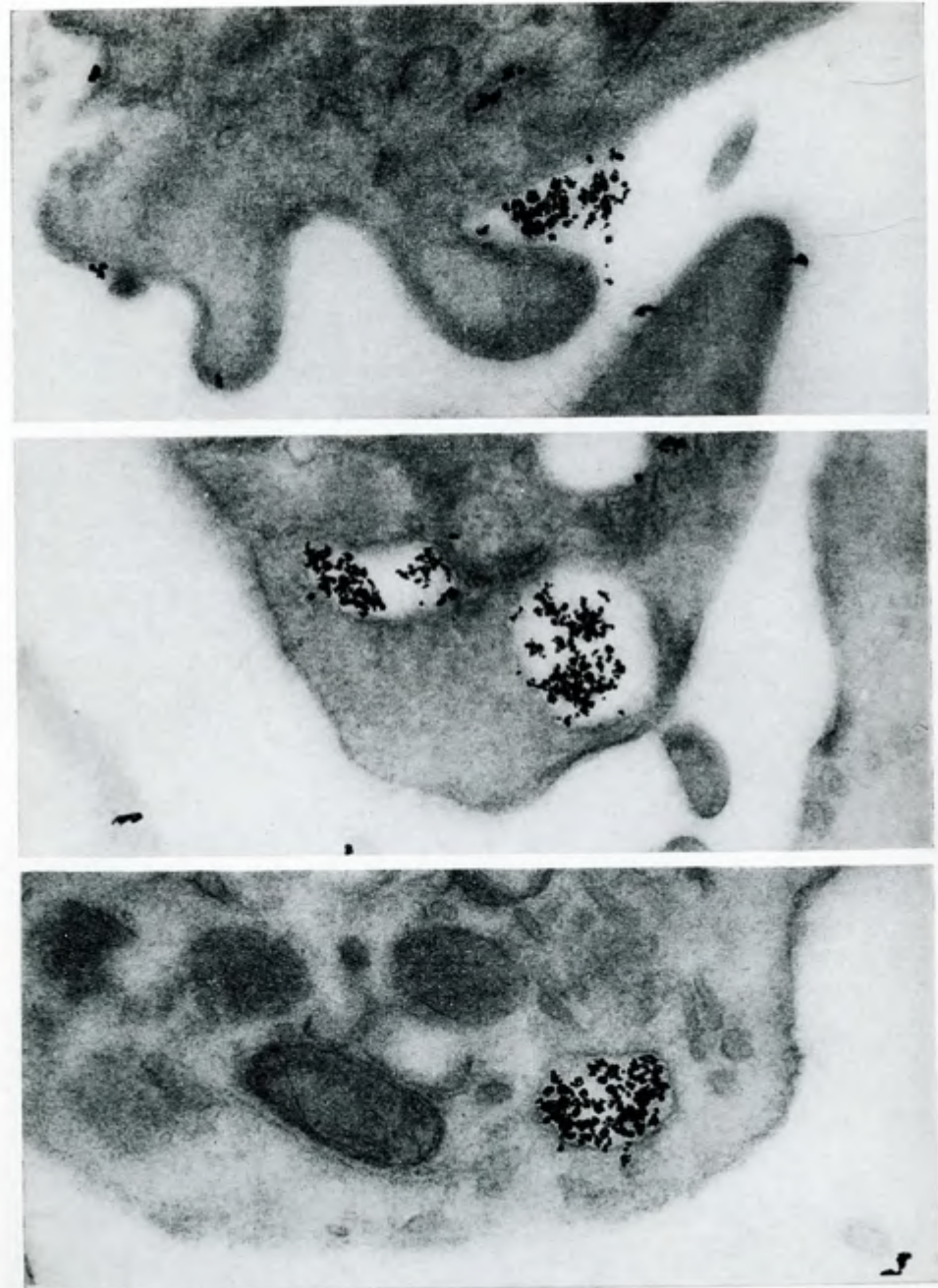


Fig. 9 — *Plaquetas humanas isoladas e postas em contacto «in vitro» com dióxido de*



Fig. 10 — *Medula óssea do Ratinho injectado com torotraste. Megacariócito.*
 No centro, núcleo volumosos muito lobulado. No citoplasma percebem-se duas zonas:
 uma perinuclear com poucos elementos e outra periférica com abundantes sistemas
 de membranas e grânulos. $\times 5.200$



Fig. 11 — *Medula óssea do Ratinho.*
Megacariocito contendo no seu interior um eosinófilo. $\times 11.000$

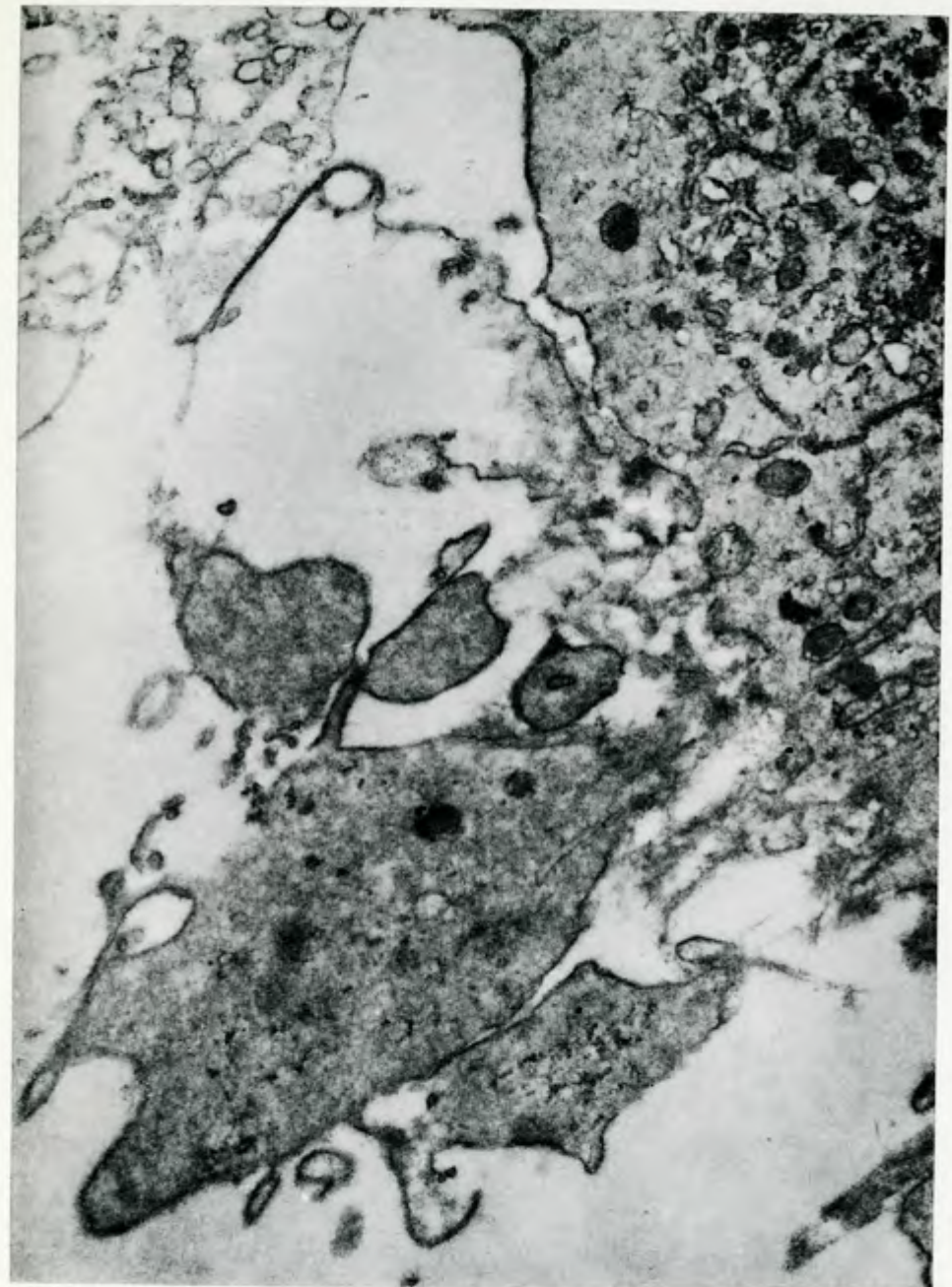


Fig. 12 — *Medula óssea do Coelho injectado com torotraste.*
Região periférica de um megacariócito em que se observam os sistemas de duplas membranas e grânulos α . Uma plaqueta que acaba de formar-se está a separar-se do megacariócito precursor. $\times 30,500$