

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

MODERADORES

PROF. MAXIMINO CORREIA — PROF. A. TAVARES DE SOUSA
PROF. HERMÊNIO CARDOSO — PROF. A. SIMÕES DE CARVALHO

INDEX

ARMANDO ANTHÉMIO MACHADO SIMÕES DE CARVALHO — <i>Estudo da distribuição de esforços no fémur humano pela técnica dos vernizes frágeis</i>	N 1
M. A. TEIXEIRA DA SILVA — <i>Possibilidades do método de coloração de Piéchaud em citologia bacteriana</i>	N 2
M. A. TEIXEIRA DA SILVA — <i>A aplicação da técnica de Mason e Powelson ao estudo de algumas alterações morfológicas induzidas pela penicilina na Escherichia Coli</i>	N 3
ARMANDO ANTHÉMIO MACHADO SIMÕES DE CARVALHO — <i>Breve nota sobre uma anomalia esquelética da mão</i>	N 4
ARMANDO ANTHÉMIO MACHADO SIMÕES DE CARVALHO e MARIA ISABEL COELHO DE OLIVEIRA MALAQUIAS — <i>Nota prévia sobre o estudo dos cromosomas humanos</i>	N 5
ABEL SAMPAIO TAVARES — <i>Alterações da circulação linfática na estase venosa (alguns aspectos experimentais)</i>	N 6
MÁRIO DO NASCIMENTO FERREIRA — <i>Aspectos ultra-estruturais do epitélio intestinal. I. A célula caliciforme diferenciada</i>	N 7
HERMÊNIO CARDOSO e ARMANDO AUGUSTO PENAS LEAL GONSALVES — <i>Origem das artérias septais do coração do Canis familiaris</i>	N 8

VOL. XXXVI



1962

« IMPRENSA DE COIMBRA, L.^{DA} »
M C M L X II

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 1

ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE ESFORÇOS NO FÉMUR HUMANO PELA TÉCNICA DOS VERNIZES FRÁGEIS

POR

ARMANDO ANTHÉMIO MACHADO SIMÕES DE CARVALHO
Professor Extraordinário da Faculdade de Medicina

Num trabalho anteriormente publicado (1), referimo-nos às observações de Koch acerca da estrutura trabecular da epífise superior do fémur, e do papel que semelhante dispositivo desempenha na transmissão dos esforços à diáfise.

Vimos, com efeito, que Koch reconhece, na extremidade superior do fémur, dois sistemas distintos de trabéculas (Fig. 1): o *sistema interno ou medial*, e o *sistema externo ou lateral*. O sistema interno é compressivo, isto é, o mais solicitado à compressão quando se carrega a cabeça do fémur. Começa no pequeno trocanter e dali dirige-se em curvas suaves para o lado oposto, segundo

(1) A distribuição de esforços na epífise superior do fémur estudada pela técnica dos vernizes frágeis. Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis, Vol. XXXV, n.º 12.



dois grupos distintos: o *grupo inferior ou compressivo secundário* que da lâmina diafisária interna (proximidades

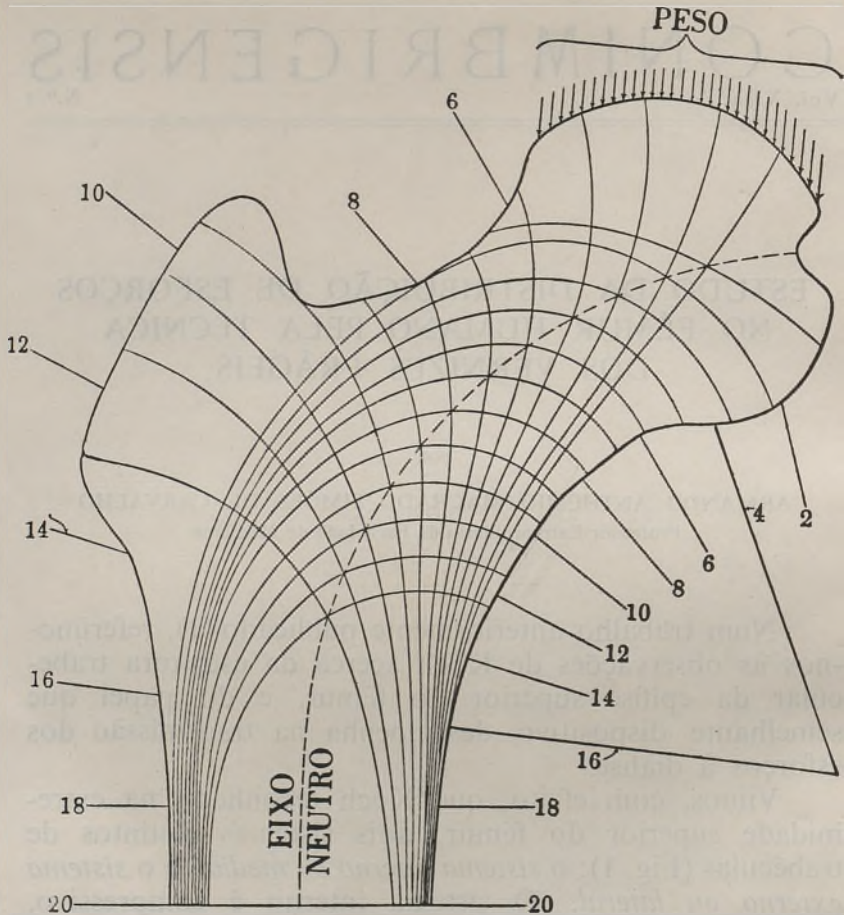


FIG. 1 — Diagrama das linhas de força, segundo Koch

do pequeno trocater) se dirige em suaves curvas ao grande trocater, e o *grupo inferior ou compressivo principal*, que aproximadamente do mesmo ponto se dirige para a parte superior da superfície articular da cabeça do fêmur.

O sistema externo é tensivo, quer dizer, o solicitado à tracção quando igualmente se carrega a cabeça do fêmur. Consta de três grupos: o *grupo do grande trocanter* que da lâmina diafisária externa se dirige em graciosa curva

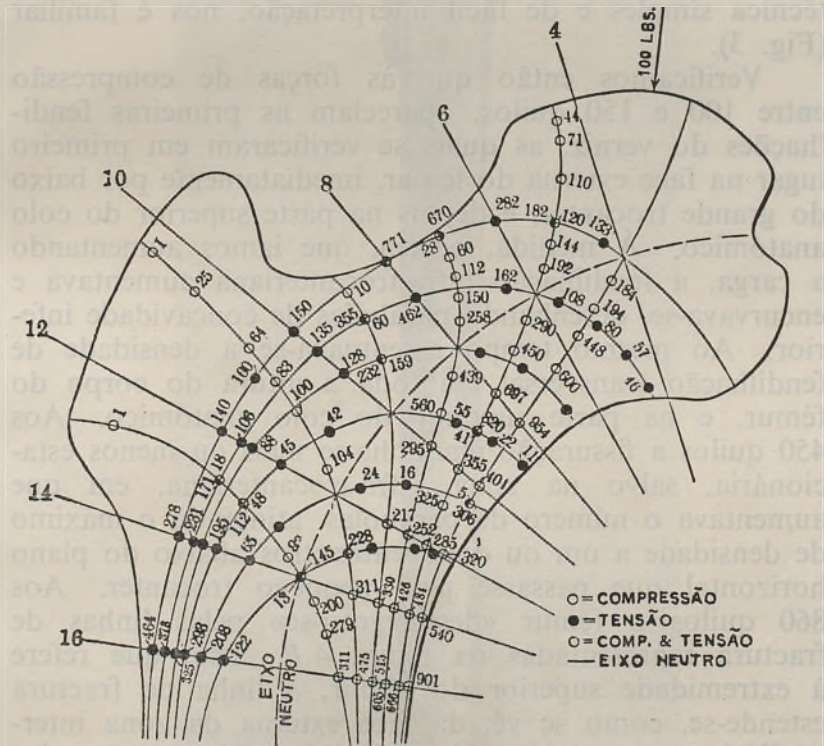


FIG. 2 — Valores de esforços tensivos e compressivos, para uma carga de 100 libras (segundo Koch)

para a parte inferior da cabeça do fêmur; o *grupo tensivo principal* que do mesmo ponto, mas em curva mais fechada se dirige para a porção inferior da cabeça; o *grupo tensivo secundário*, finalmente, que se dirige para a parte inferior do colo cirúrgico.

Koch chegou mesmo a determinar, por análise matemática, os valores compressivos e tensivos para determinada carga, conforme se pode ver na figura 2.

Ora o método de Koch, que por ser matemático possui o mérito do rigor, tem todavia a desvantagem de estar acima das nossas possibilidades. Por isso ensaiamos o processo dos vernizes frágeis que, além de ser duma técnica simples e de fácil interpretação, nos é familiar (Fig. 3).

Verificamos então que às forças de compressão entre 100 e 150 quilos, apareciam as primeiras fendilhações do verniz, as quais se verificaram em primeiro lugar na face externa do fêmur, imediatamente por baixo do grande trocanter, e depois na parte superior do colo anatómico. À medida, porém, que iam aumentando a carga, a fendilhação infra-trocanteriana aumentava e encurvava-se, desenhando parábolas de concavidade inferior. Ao mesmo tempo assentava-se a densidade de fendilhação transversal em toda a altura do corpo do fêmur, e na parte superior do colo anatómico. Aos 450 quilos a fissuração mantinha-se mais ou menos estacionária, salvo na zona infra-trocanteriana, em que aumentava o número de parábolas, atingindo o máximo de densidade a um ou dois centímetros abaixo do plano horizontal que passasse pelo pequeno trocanter. Aos 860 quilos o fêmur «desintegrou-se» pelas linhas de fractura representadas na figura 4 B. Pelo que refere à extremidade superior do fêmur, a linha de fractura estende-se, como se vê, da face externa da zona intermediária ao corpo e ao colo cirúrgico, até à parte superior do colo anatómico.

Verifica-se pois uma transmissão quase integral da carga recebida na cabeça para o corpo do osso, e tanto assim, que aumentando a carga, a fractura verifica-se simultaneamente no corpo (tangencialmente, a nível da maior densidade de fendilhação parabólica) e no colo anatómico (perpendicularmente).

Esta quase completa transmissão de esforços da cabeça do fêmur para o corpo, é devida ao dispositivo trabecular em ogivas (Fig. 5). Prova-o uma outra expe-

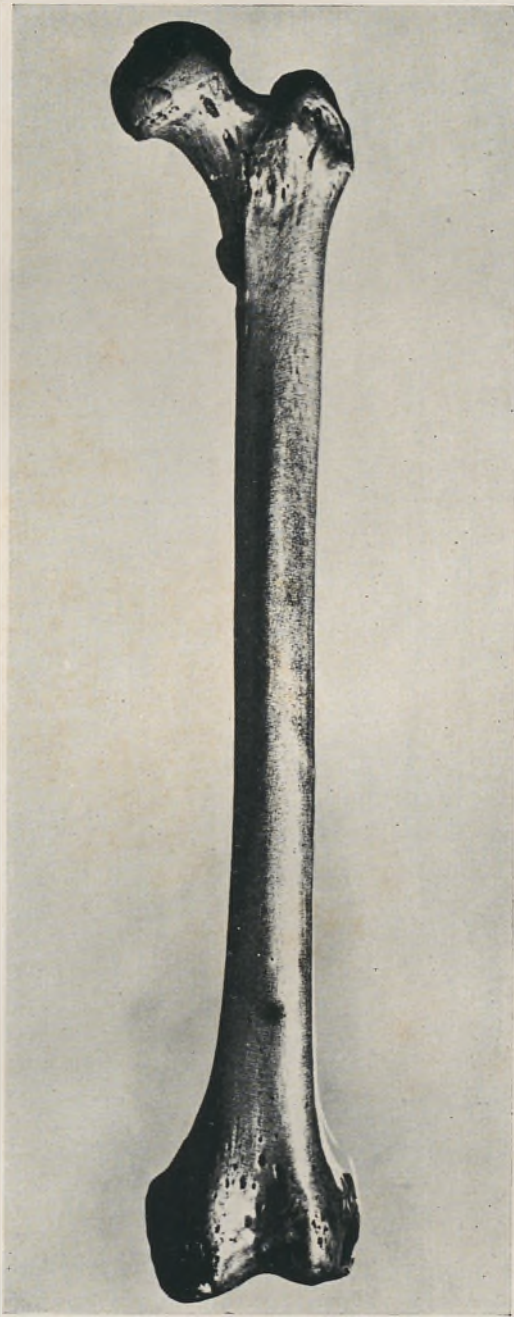


FIG. 3—Femur humano tratado pelo verniz, depois de ter sido submetido a carga.

riência que consistiu em submeter à força de compressão

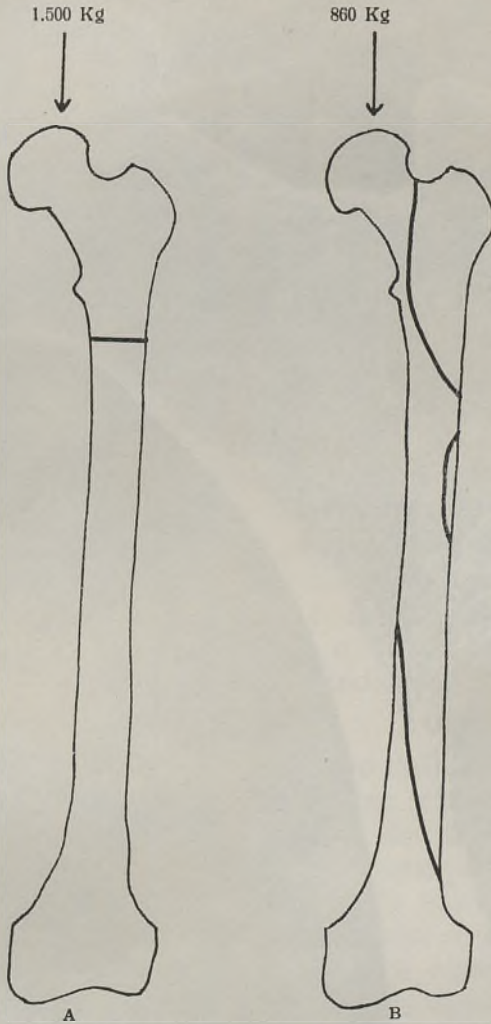


FIG. 4 — Linhas de fractura verificadas no fémur de ferro fundido (A) e no fémur humano (B).

uma peça de ferro fundido, perfeita réplica dum fémur humano (Fig. 6), mas de estrutura homogénia, como

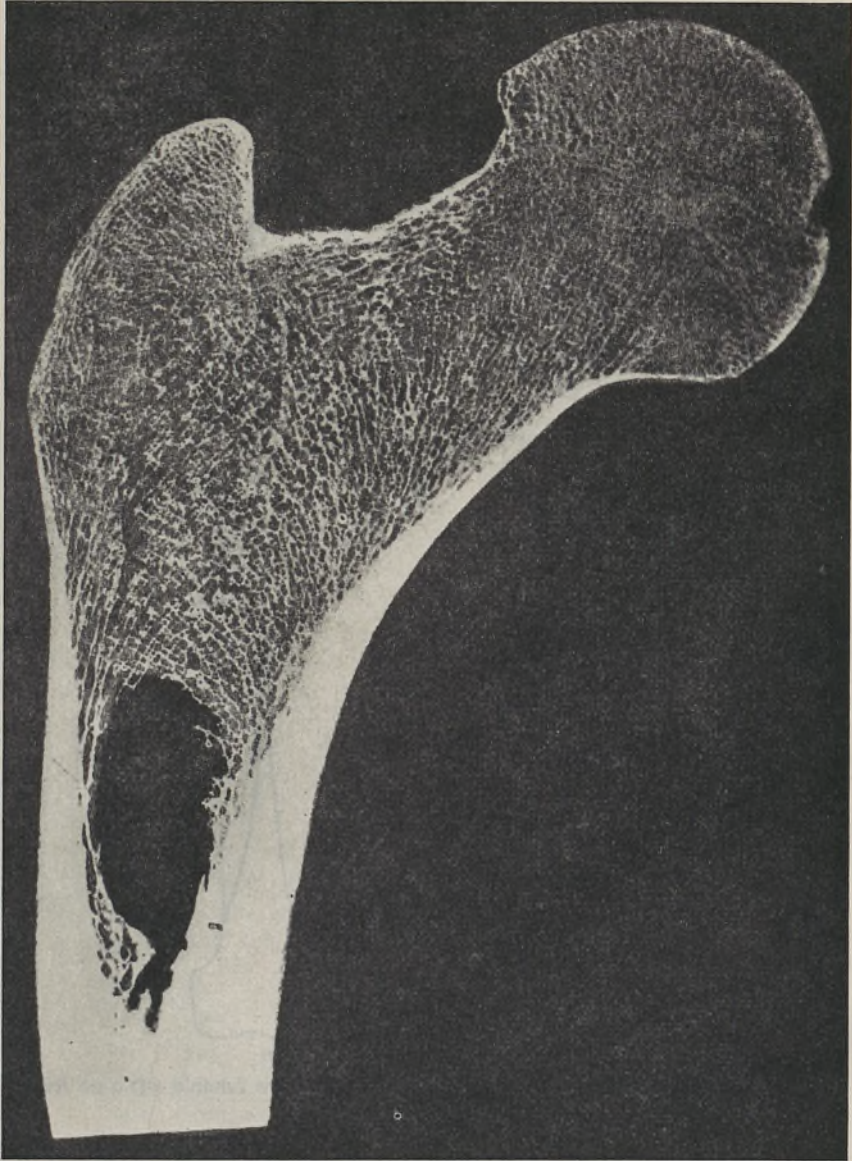


FIG. 5 — Estrutura trabecular da extremidade superior do fêmur (Werner Spaltheholz-Atlas de Anatomia Humana).

é óbvio. Em vez de verificarmos aquela transmissão de esforços da cabeça para o corpo, como acontecia no fémur humano, vimos os esforços concentrarem-se no colo cirúrgico, a avaliar pela grande densidade de fissurações transversais do verniz aquele nível, onde aliás a peça acabou por fracturar-se em consequência do aumento da força de compressão (Fig. 4 A).

Uma vez considerada a maneira por que se faz a transmissão de esforços na epífise superior do fémur, vejamos como se comporta a diáfise e a epífise inferior.

À força de compressão compreendida entre 100 e 150 quilos, aparecem as primeiras fendilhações do verniz em toda a altura do corpo do fémur e na sua extremidade inferior. Esta fendilhação é toda francamente transversal, tornando-se cada vez mais numerosa (por conseguinte cada vez mais densa) à medida que aumentamos a força de compressão. Aos 550 quilos o verniz que revestia o corpo do fémur e a sua extremidade inferior apresentava o aspecto de estriação total, de cima a baixo. Aos 860 quilos o fémur «desintegrou-se» segundo as linhas de fractura indicadas na Fig. 4 B.

É muito fácil a interpretação da fissuração do verniz.

Os esforços que ocorrem na extremidade superior do fémur, são quase totalmente descarregados no corpo do mesmo osso, onde se distribuem segundo linhas de força verticais. Estes esforços são uniformemente distribuídos, visto as fissurações serem todas transversais, muito próximas umas das outras e equidistantes.

As linhas de força que assim descem ao longo da diáfise femoral, dividem-se na epífise inferior, indo umas para o condilo interno e outras para o condilo externo. Esta distribuição deve ser em partes iguais porquanto a fissuração do verniz em qualquer dos condilos é transversal e igualmente densa.

Os ensinamentos que se colhem da aplicação da técnica dos vernizes frágeis ao estudo da transmissão de esforços no fémur, estão inteiramente de acordo com



FIG. 6—*A*—Femur humano. *B*—Femur de ferro fundido.

o dispositivo trabecular do mesmo osso, de que aliás exclusivamente depende a transmissão dos esforços.

Com efeito, na extremidade superior (conforme tivemos o ensejo de verificar num trabalho anteriormente publicado e já referido) as linhas de força seguem a direcção das ogivas que as trabéculas desenham, sendo descarregada essa força no corpo do fémur. O corpo

do fémur recebe e conduz esse esforço através das suas paredes de tecido ósseo compacto, tanto mais intensamente quanto mais à superfície se considerar, por força

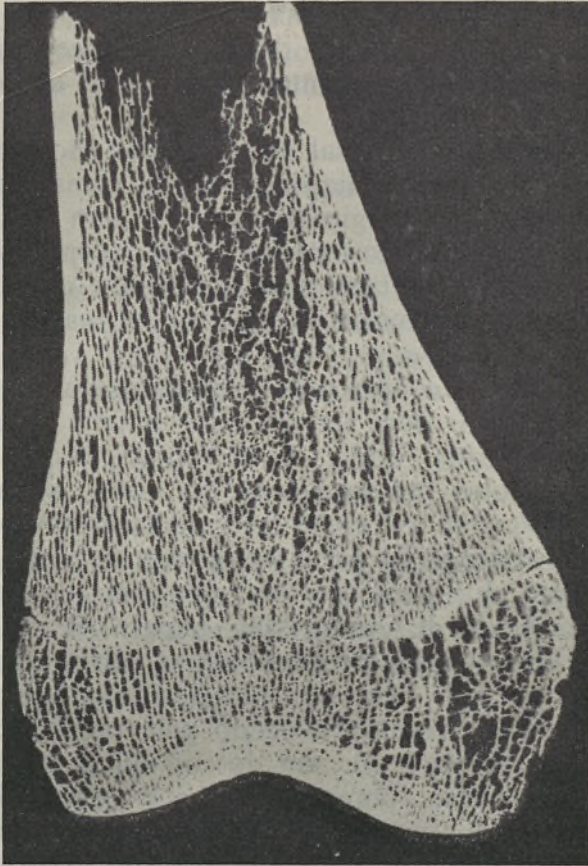


FIG. 7 — Estrutura trabecular da extremidade inferior do fémur (Werner Spaltheholz -Atlas da Anatomia Humana).

do *momento de inclinação*. Assim, pois, o eixo do osso é neutro, e sendo neutro, a sábia Natureza escavou-o, em obediência ao universal princípio da economia.

Na extremidade inferior (Fig. 7) observam-se dois

sistemas trabeculares, o *sistema longitudinal* e o *sistema transversal*.

No sistema longitudinal as trabéculas nascem nas paredes do corpo e dali dirigem-se verticalmente para baixo, paralelamente ao eixo do corpo, até à linha epifisária, encurvando-se depois o necessário para acabarem perpendicularmente à superfície articular dos condilos.

No sistema transversal as trabéculas são mais finas, e conforme o nome indica dispõem-se transversalmente.

As trabéculas longitudinais conduzem os esforços provenientes do tecido compacto do corpo do fémur às tuberosidades da tibia por intermédio dos condilos. As trabéculas transversais destinam-se a manter a união das longitudinais.

O alargamento brusco que caracteriza a extremidade inferior do fémur deve ter por fim conferir certa estabilidade ao membro inferior. Se na verdade os dois condilos estivessem muito próximos um do outro, seria fácil e portanto frequente a luxação da articulação do joelho por adução ou abdução da perna em relação à coxa.

O facto do fémur se ter fracturado em estilhaços quando a força de compressão atingiu os 860 quilos, segundo linhas nitidamente oblíquas, nomeadamente a inferior (Fig. 4 B) deve ter sido devido a um provável desequilíbrio do fémur provocado pela própria compressão, o qual fez com que um dos condilos, neste caso o interno, ficasse mais sobrecarregado que o outro. De resto, uma força de compressão de 860 quilos, está necessariamente muito acima de toda a margem de segurança com que por certo a Natureza dotou o fémur humano!

Trabalho do Laboratório de Anatomia Normal e do Centro de Estudos Morfológicos da Faculdade de Medicina de Coimbra, subsidiado pelo Instituto de Alta Cultura.
Director: Prof. MAXIMINO CORREIA.

RESUMO

O autor estuda a transmissão de esforços no fêmur humano pela técnica dos vernizes frágeis, e relaciona essa transmissão dos esforços com a estrutura da epífise superior, da diáfise e da epífise inferior do osso.

RÉSUMÉ

L'auteur étudie la transmission des efforts dans le fémur humain, employant la technique des vernis craquelants, et il rapporte cette transmission des efforts avec la disposition trabéculaire de l'épiphyse supérieure, e de la diaphyse et de l'épiphyse inférieure de l'os.

SUMMARY

The author has studied the transmission of stresses in the human femur with the technique of frail lacquers, and relates this transmission of stresses with the trabecular structure of the upper epiphysis, diaphysis and lower epiphysis of the bone.

BIBLIOGRAFIA

- BORGES (JÚLIO FERRY) — Estudo experimental do campo de tensões pela rotura duma camada aderente. Separata da revista «Tecnica», 1947.
- CARDOSO (EDGAR A. MESQUITA) — Alguns métodos de cálculo experimental e sua aplicação ao estudo de pontes. Cap. VI, Lisboa, 1950.
- CARVALHO, ARMANDO ANTHÉMIO MACHADO SIMÕES DE — Ensaio da técnica dos vernizes frágeis para o estudo da distribuição de esforços nos ossos. *Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis*, Vol. XXXII, N.º 11.
- , — Nota prévia sobre a transmissão de esforços no crânio. *Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis*, Vol. XXXIV, N.º 7.
- , — Estudo da distribuição de esforços nas costelas pela técnica dos vernizes frágeis. *Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis*, Vol. XXXV, N.º 7.
- , — A distribuição de esforços na epífise superior do fémur estudada pela técnica dos vernizes frágeis. — *Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis*, Vol. XXXV, n.º 12.
- DIETRICH (O.) e LEHR (E.) — Das Dehnungslinienverfahren-Zeitschrift des Vereines Deutscher Ingenieure, Vol. 76, Out., 1932. Cit. in Laginha Serafim: Determinação de tensões em vernizes frágeis, Lisboa, 1953.
- ELIES (E. D.), CURT LESSEN e RODOLFO NICKMANN — Manual teórico-Parático del Hormigon, Vol. II, Buenos Aires, Rio de Janeiro, Lima, Caracas, 1957.
- FORESTE (A. V.), ELLIS (G.) and STERN (F. B.) — Brittle coatings for quantitative strain measurements, *J. Applied Mechanics*, Dec., 1942. Cit. in Laginha Serafim loc. cit.
- GRAY (HENRY) — Tratado de Anatomia Humana, Vol. I, 1946.
- GURDJIAN (E. S.) and LISSNER (H. R.) — Deformations of the skull in head injury studied by the Stresscoat technique. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, Vol. B, 1940.
- KOCH — The Laws of Bone Architecture. *Am. Journ. of Anat.*, 21, 1917. Cit. in Gray (Henry), *Loc. cit.*
- LISSNER (H. R.) and GURDJIAN, M. D. — A study of the mechanical behavior of the skull and its contents subjected to injuring blows. *Proceedings of the Society Experimental Stress Analysis*, Vol. III, 1946.
- , —, and WEBSTER (J. E.) M. — Mechanics of skull fracture. *Proceedings of the Society Experimental Stress Analysis*, Vol. VII, N.º 1, 1949.

- ROUVIER (H.) — Anatomie Générale. Origines des formes et des structures anatomiques, 1939.
- SALMON (B.) — L'analyse des contaients par la méthode des vernis craquelants. Technique et Ciencias Aeronautiques, N.º 6, 1949. Cit. in Laginha Serafim, *loc. cit.*
- SERAFIM (Joaquim Laginha) — Determinação de tensões com vernizes frágeis. Lisboa, 1953.
- SPALTEHOLZ (Werner) — Atlas de Anatomia Humana, vol. I, 1944.
- STOCKEY (W. F.) — MIT Thesis, Xech. Eng. Dept., 1950. Cit. in Laginha Serafim, Lisboa, 1953.
- TIMOSHENKO (S.) — Resistencia de materiales, Madrid, 1947.

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 2

POSSIBILIDADES DO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE PIÉCHAUD EM CITOLOGIA BACTERIANA *

POR

M. A. TEIXEIRA DA SILVA

2.º Assistente da Faculdade de Medicina do Porto

Os métodos de coloração derivados do processo de Romanowsky, nomeadamente o método de Giemsa, quando aplicados às bactérias não evidenciam claramente os seus corpos cromatínicos, a menos que se proceda a uma hidrólise prévia por ácidos (1, 2) ou pela ribonuclease (3).

Como se sabe, o corante de Giemsa, além de eosinato de azur II, contém azur II livre. Na opinião de Piéchaud (4, 5) a quantidade de azur II livre existente no Giemsa habitualmente usado em hematologia é exagerada para uma boa coloração dos corpos cromatínicos das bactérias. Este Autor (5) conseguiu corar satisfatoriamente, sem hidrólise, essas estruturas utilizando um soluto de Giemsa a que havia juntado eosina. Descreveu ainda vários solutos corantes com eosinatos de tiazinas

(*) Um resumo deste trabalho foi apresentado nas Reuniões dos Serviços Laboratoriais e Clínicos da Faculdade de Medicina do Porto em 29 de Março de 1962.

que permitem uma boa coloração dos corpos cromatínicos das bactérias (4, 5, 6). Tronnier (7) descreveu um processo idêntico que utiliza uma mistura de eosina, azur I e azul de metileno.

Os trabalhos destes Autores representam o aperfeiçoamento de processos anteriormente ensaiados, nomeadamente por Badian (8).

A documentação fotográfica apresentada por Piéchaud diz respeito a *E. coli* (5, 9), *B. cereus* (5, 9) e várias espécies de *Moraxella* (9, 10) cultivados em condições normais. Tronnier (7) não apresenta fotografias. Hopwood e Glauert (11) aplicaram o método de Piéchaud à coloração dos corpos cromatínicos do *Streptomyces coelicolor*.

Por nossa parte, e como ponto de partida para um estudo mais pormenorizado, aplicámos o método de Piéchaud à coloração de bactérias cultivadas não só em condições normais mas também em condições que modificam a morfologia dos seus corpos cromatínicos. A morfologia adquirida nestas condições é bem conhecida através de trabalhos de vários Autores que utilizaram outros métodos de coloração e, portanto, fornece material útil para comparação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as seguintes estirpes: *Escherichia coli* n.º 8196, *Bacillus cereus* n.º 7587 e *Bacillus megaterium* n.º 7581 da N.C.T.C. de Londres.

1 — Estas estirpes foram cultivadas em «Brain Heart Agar» (Difco) durante 24 horas, passadas para meio fresco durante 4 horas e, finalmente, passadas para novo meio e incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37° C. Ao fim desse tempo, cortaram-se blocos de meio de cultura com os quais se fizeram impressões em lamelas. Estas foram rapidamente mergulhadas em metanol absoluto

(Merck) e fixadas durante, pelo menos, 10 minutos (geralmente várias horas).

Das técnicas descritas por Piéchaud para a preparação do corante, ensaiámos a que se baseia na adição de eosina ao Giemsa (5). Utilizámos água da torneira com pH 7,4, soluto Giemsa R-66 (Gurr) e eosina (Grubler). A coloração foi feita à temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos.

Após a coloração, as lamelas foram montadas em água ou no corante e fotografadas dentro de poucos minutos. Para a obtenção de preparações mais duradouras vários processos podem ser utilizados, como o de Minsavage (12) ou a montagem em resinas após desidratação em acetona e passagem pelo xilol.

O equipamento óptico utilizado foi o seguinte: condensador acromático-aplanático de A.N. 1,30; objectiva Fluotar 100 ×, de A.N. 1,30; ocular Phot 10 ×; câmara fotográfica II (Wild). A iluminação foi ajustada para o tipo Köhler, utilizando-se uma lâmpada de Xenon XBO-162. Os seguintes filtros (Wild) foram usados: filtro interferencial de 595 m μ , filtro amarelo GG 11 e filtro azul BG 7. O primeiro foi utilizado com incidências que fornecem luz verde e luz alaranjada e os dois últimos foram empregados em conjunto para obtenção de luz verde. Os negativos foram obtidos em película «Panatomic X» (Kodak) com a ampliação de 812 diâmetros. A ampliação dos positivos vai indicada nas legendas das figuras.

2 — Ensaiámos também a mesma coloração nas estirpes indicadas submetidas às seguintes condições:

a) — *E. coli* sob a acção da tetraciclina: a cultura desta bactéria utilizada em 1 foi inoculada em placas com o mesmo meio de cultura adicionado de 1 micrograma por mililitro de tetraciclina (Pfizer).

b) — *B. cereus* submetido à acção do aumento de concentração de ClNa: a mesma cultura desta estirpe

utilizada em 1 foi transferida para o mesmo meio adicionado de 3% de ClNa (aumento de 0,5% para 3,5% de ClNa) previamente aquecido a 37° C. A placa foi então incubada durante 5 minutos a 37° C.

c) — *B. megaterium* submetido à acção do arrefecimento: a mesma cultura desta bactéria usada em 1 foi colocada a 10° C durante 45 minutos.

Com todas estas culturas procedemos da mesma maneira que com as culturas descritas em 1 para a fixação, coloração e microfotografia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas figuras 1 a 7 podem ver-se os aspectos obtidos com a aplicação do método de Piéchaud à coloração das células bacterianas preparadas como descrevemos atrás.

Os corpos cromatínicos aparecem corados de vermelho-púrpura, pelo que são mais contrastados com iluminação verde. O citoplasma fica corado de azul e com uma tonalidade que depende da quantidade de eosina adicionada ao Giemsa; é mais claramente visível com iluminação por luz alaranjada.

Jacobson e Webb (13), utilizando o May Grunwald-Giemsa, mostraram que a desoxi-ribonucleoproteína nuclear se cora especificamente de vermelho-púrpura enquanto que a ribonucleoproteína toma a cor azul. É interessante comparar as figuras 2 e 3 correspondentes ao mesmo campo fotografado, respectivamente, com luz verde (corpos cromatínicos em escuro, citoplasma em claro) e com luz alaranjada (corpos cromatínicos em claro, citoplasma em escuro).

Se se utilizar uma quantidade de eosina que produza uma tonalidade clara no citoplasma, os corpos cromatínicos são nitidamente visíveis mesmo sem iluminação especial por luz verde.

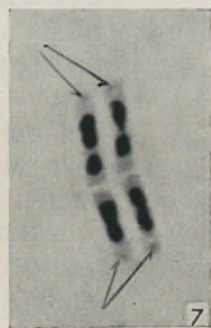
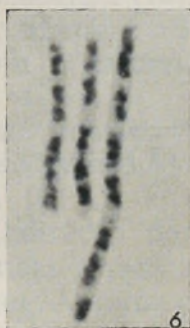
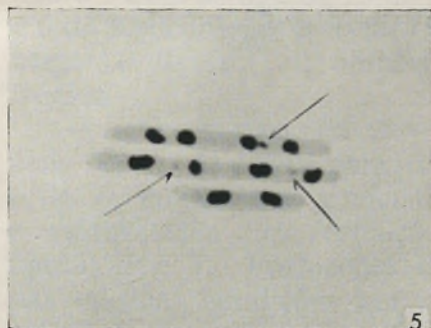
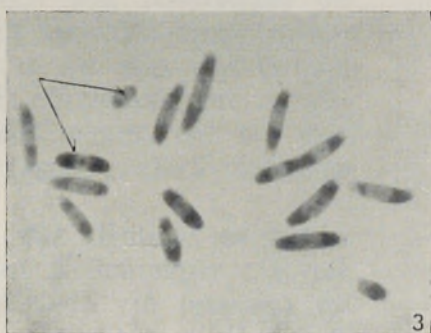
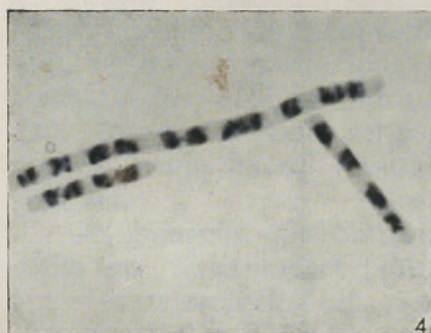
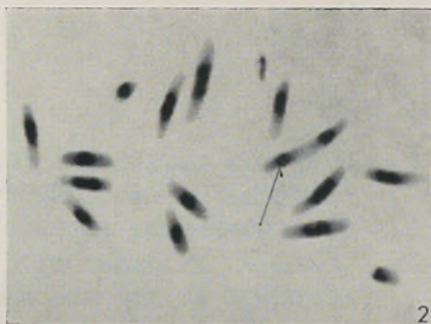
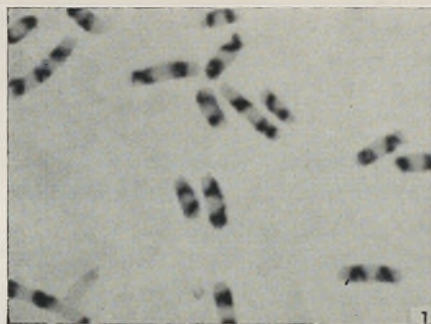


FIG. 1 — *E. coli*. Cultura com 1 hora e 30 minutos. Fixação pelo metanol. Coloração pelo Giemsa + eosina (15 minutos). Fotografia com luz verde. Ampliação: 3.200 \times .

FIG. 2 — *E. coli*. Mesma cultura que a da figura 1 após 3 horas e 30 minutos de incubação em presença de 1 micrograma /ml de tetraciclina. Metanol. Giemsa + eosina (15 minutos). Luz verde. 3.200 \times .

FIG. 3 — Mesmo campo que o anterior fotografado com luz alaranjada. 3.200 \times .

FIG. 4 — *B. cereus*. Cultura de 1 hora e 30 minutos. Metanol. Giemsa + eosina (15 minutos). Luz verde. 3.200 \times .

FIG. 5 — *B. cereus*. Mesma cultura que a anterior, 5 minutos depois de transferida para um meio idêntico adicionado de 3% de CINa. Metanol. Giemsa + eosina (15 minutos). Luz verde. 3.200 \times .

FIG. 6 — *B. megaterium*. Cultura de 1 hora e 30 minutos. Metanol. Giemsa + eosina (30 minutos). Luz verde. 3.200 \times .

FIG. 7 — *B. megaterium*. Mesma cultura que a anterior, 45 minutos depois de incubada a 10° C. Metanol. Giemsa + eosina (30 minutos). Luz verde. 3.200 \times .

Nas figuras apresentadas, que constituem exemplos representativos de várias observações, é de salientar:

1 — O aspecto da *E. coli* cultivada em presença de tetraciclina. É particularmente interessante a microfotografia obtida com luz alaranjada em que se evidencia uma formação central nos corpos cromatínicos (figura 3, formações assinaladas com setas). Por observação do mesmo campo com iluminação por luz verde, essas formações aparecem como zonas claras no seio dos corpos cromatínicos. Na microfotografia correspondente, a referida formação pode ver-se, pelo menos, em um dos corpos cromatínicos (figura 2, espaço claro indicado pela seta).

As imagens que obtivemos são idênticas às publicadas por Kellenberger (14) e por Kellenberger e Ryter (15, 16) referentes a *E. coli* cultivada em presença de clorotetraciclina. É de notar a semelhança da nossa figura 3 com as figuras 15 de Kellenberger (14), figuras 5 c e 6 de Kellenberger e Ryter (15) e figuras 1 e 3 de Kellenberger e Ryter (16), obtidas com o microscópio electrónico.

2 — O aspecto do *B. cereus* transferido do meio com 0,5 % de ClNa para o meio com 3,5 % de ClNa e do *B. megaterium* arrefecido a 10° C. É de salientar a evidenciação das formações indicadas por setas nas figuras 5 e 7. Formações idênticas foram encontradas nas mesmas condições por outros Autores com outros métodos de coloração. Comparar, por exemplo, as nossas figuras 5 e 7 com as figuras 5 a 8 de Hunter-Szybalska, Szybalski e DeLamater (17), com a figura 7 de Whitfield e Murray (18) e com a figura 27 de Robinow (19). Robinow (19) sugeriu que estas granulações correspondem aos elementos membranosos intracitoplasmáticos observados recentemente com o microscópio electrónico em cortes ultra-finos de várias bactérias preparados por métodos aperfeiçoados (Hopwood e Glauert (20), Glauert e Hopwood (21), Fitz-James (22), van Iter-

son (23) e outros; para revisão deste problema ver referência (24)).

Os resultados que acabamos de descrever confirmam e ampliam os de Piéchaud. Comparando-os com os que se obtém com os processos habituais de evidenciação dos corpos cromatínicos (Piekarski-Robinow (1, 2), Tulasne e Vendrely (3), DeLamater (25) e Hartman e Payne (26)), podemos dizer:

1 — O método de Piéchaud permite obter colorações duma maneira geral concordantes com as que se obtém pelos métodos correntes utilizados para o mesmo fim. Diferenças no tamanho e em pormenores de estrutura dos corpos cromatínicos são encontrados.

2 — O método de Piéchaud é mais simples que os restantes métodos utilizados para o mesmo fim, dispensando a hidrólise ácida ou enzimática obrigatória nestes. É de notar que alguns Autores (Vendrely (27), Robinow (28) e Kellenberger (29), por exemplo) admitem que a hidrólise ácida pode modificar a morfologia dos corpos cromatínicos. Além disso, como Vendrely e Lipardy (30) demonstraram, a hidrólise ácida remove parte do ácido desoxi-ribonucleico da célula bacteriana.

3 — O método de Piéchaud, como o de Hartman e Payne (26) (método semelhante de coloração sem hidrólise, baseado no trabalho de Jacobson e Webb (13)) cora simultâneamente os dois tipos de nucleoproteínas, o que pode ser vantajoso. As imagens que obtivemos, bem como as publicadas por Piéchaud (9) mostram mais pormenores e são mais claras que as publicadas por Hartman e Payne (26) referentes a *E. coli* coradas pelo seu método (comparar a nossa figura 1 e as figuras 1 e 4 de Piéchaud (9) com as figuras 6 e 8 de Hartman e Payne (26)). Chegamos à mesma conclusão corando pelo processo de Hartman e Payne as nossas preparações de *E. coli*.

Em trabalhos ainda não publicados, aplicámos com bons resultados o presente método à coloração dos corpos

cromatínicos de esporos em germinação de *B. megaterium* e *B. cereus*, de esferoplastos de *E. coli* e protoplastos de *B. megaterium*.

O método de coloração directa dos corpos cromatínicos pelos eosinatos de azures não tem suscitado interesse entre os citologistas que se dedicam à cariologia bacteriana. Parece-nos, no entanto, merecedor dum estudo mais detalhado, principalmente num sentido citotómico. O trabalho preliminar de Jacobson e Webb (13), indicando especificidade da cor vermelho-púrpura tomada pela desoxi-ribonucleoproteína quando corada pelos corantes do tipo Giemsa, é particularmente prometedor.

*Serviço de Bacteriologia e Parasitologia
da Faculdade de Medicina do Porto*

Director: Prof. J. MACHADO VAZ

RESUMO

O método de Piéchaud de coloração directa dos corpos cromatínicos das bactérias foi aplicado a várias estirpes cultivadas em condições normais e em condições que modificam a morfologia dos seus corpos cromatínicos (cultura em presença de tetraciclina, passagem para um meio com maior concentração de ClNa e arrefecimento a 10° C).

Os resultados obtidos, confirmando e ampliando os de Piéchaud, levam à conclusão de que aquele método permite obter colorações dum maneira geral concordantes com as obtidas pelos processos correntes usados para o mesmo fim, com a vantagem de não exigir a hidrólise ácida ou enzimática obrigatórias nos outros processos.

Interessantes pormenores estruturais das células bacterianas cultivadas nas condições anormais referidas são revelados por este método, comparando-se com os que se obtêm por outras técnicas.

Esta técnica, que tem suscitado pouco interesse por parte dos citologistas que se dedicam à cariologia bacteriana, é merecedora dum estudo mais pormenorizado, principalmente num sentido citoquímico, e numa tentativa de esclarecimento da sua especificidade.

SUMMARY

Piéchaud method for direct staining of bacterial chromatin bodies was used on various strains grown under normal conditions and under conditions that modify the morphology of their chromatin bodies (culture in the presence of tetracycline, transference to a medium with higher NaCl content and culture at 10° C).

The results confirm and widen those of Piéchaud and lead to the conclusion that the staining obtained by this method is, in general, in accordance with those obtained by the methods currently used for the same effect, with the advantage that it does not need the acid or the enzymatic hydrolysis indispensable in the other ones.

Interesting details of the structure of the bacterial cells grown under the described abnormal conditions are revealed by this method. These are confronted with those obtained by other techniques.

Students of bacterial caryology have shown little interest in this technique which really deserves a more detailed study, mainly on a cytochemical basis and in a trial to elucidate its specificity.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — PIEKARSKI, G. — 1937. Cytologische Untersuchungen an Paratyphus — und Colibakterien — Arch. Mikrobiol., 8: 428-439.
- 2 — ROBINOW, C. F. — 1945. Addendum de «The Bacterial Cell», por R. J. Dubos — Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts.
- 3 — TULASNE, R. e VENDRELY, R. — 1947. Demonstration of bacterial nuclei with ribonuclease — Nature, Lond., 160: 225-226.
- 4 — PIÉCHAUD, M. — 1951. Coloration directe du noyau des bactéries et des levures — Bull. Micro. Appl., 1: 178-181.
- 5 — — — 1954. La coloration sans hydrolise du noyau des bactéries — Ann. Inst. Pasteur, 86: 787-793.
- 6 — — — 1949. Coloration des corps chromatiques des enterobactériacées par un colorant neutre sans hydrolise préalable — Ann. Inst. Pasteur, 76: 66-67.
- 7 — TRONNIER, E. A. — 1953. Zur Darstellung des Nukleioide bei Bakterien mit Azur-Eosin — Naturwiss., 40:511-512.
- 8 — BADIAN, J. — 1933. Eine cytologische Untersuchung über das Chromatin und den Entwicklungszyklus der Bakterien — Arch. Mikrobiol., 4: 409-418.
- 9 — PIÉCHAUD, M. — 1961. A propos de la photomicrographie en cytologie bactérienne — Bull. Micro. Appl., 11:85-90.
- 10 — — — 1961. Le Groupe Moraxella. A propos des B 5 W — *Bacterium anitratum* — Ann. Inst. Pasteur, 1:74-85.
- 11 — HOPWOOD, D. A. e GLAUERT, A. M. — 1960. Observations on the chromatin bodies of *Streptomyces coelicolor* — J. Biophys. Biochem. Cytol., 8: 257-265.
- 12 — MINSAVAGE, E. J. — 1955. A permanent mounting procedure for bacteria. — Stain Technol., 30: 231-233.
- 13 — JACOBSON, W. e WEBB, M. — 1952. The two types of nucleoproteins during mitosis — Exptl. Cell Res., 3: 163-183.
- 14 — KELLENBERGER, E. — 1953. Les formes caractéristiques des nulceoides de *E. coli* et leurs transformations dues a l'action d'agents mutagenes-inducteurs et de bacteriophages. In Simpósio «Bacterial Cytology», Fondazione Emanuele Paterno, Roma. Pág. 45-66.
- 15 — — — e RYTER, A. — 1955. Contribution à l'étude du noyau bactérien — Schweiz. Z. allg. Path. Bakt., 18: 1122-1137.
- 16 — — — — 1956. Fixation et inclusion du materiel nucléaire de *Escherichia coli*. Experientia, 12: 420-421.

- 17 — HUNTER-SZYBALSKA, M. E.; SZYBALSKI, W. e DELAMATER, E. D. — 1956. Temperature synchronization of nuclear and cellular division in *Bacillus megaterium* — J. Bact., 71: 17-24.
- 18 — WHITFIELD, J. F. e MURRAY, R. G. E. — 1956. The effect of the ionic environment on the chromatin structures of bacteria. Canad. J. Microbiol., 2: 245-260.
- 19 — ROBINOW, C. F. — 1960. Outline of the visible organization of Bacteria. In «The Cell». Academic Press. Editado por Brachet e Mirsky. Vol. IV, pág. 45-108.
- 20 — HOPWOOD, D. A. e GLAUERT, A. M. — 1958. The electron microscopy of *Streptomyces coelicolor*. — J. Gen. Microbiol., 18, vi-vii.
- 21 — CLAUERT, A. M. e HOPWOOD, D. A. — 1959. A membranous component of the cytoplasm in *Streptomyces coelicolor*. — J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 515-516.
- 22 — FITZ-JAMES, P. C. — 1960. Participation of the cytoplasmic membrane in the growth and spore formation of bacilli. J. Biophys. Biochem. Cytol., 8: 507-528.
- 23 — VAN ITERSON, W. — 1960. Membranes, particular organelles and peripheral bodies in bacteria. Proc. European Regional Conf. on Electron Microscopy, Delft, vol. II, 763-768.
- 24 — GLAUERT, A. M. — 1962. The fine structure of bacteria. Brit. Med. Bull., 18: 245-250.
- 25 — DELAMATER, E. D. — 1951. A staining and dehydrating procedure for the handling of microorganisms — Stain Technol., 26: 199-204.
- 26 — HARTMAN, P. E. e PAYNE, J. I. — 1954. Direct staining of the two types of nucleoproteins in *Escherichia coli*. J. Bact., 68: 237-242.
- 27 — VENDRELY, R. — 1955. Histochemistry of bacteria. Int. Review of Cytol., IV: 115-142.
- 28 — ROBINOW, C. F. — 1956. The chromatin bodies of bacteria. In «Bacterial Anatomy», Simpósio da Soc. Gen. Microbiol., pág. 181-214.
- 29 — KELLENBERGER, E. — 1960. The physical state of the bacterial nucleus. In «Microbial Genetics», Simpósio da Soc. Gen. Microbiol. pág. 39-66.
- 30 — VENDRELY, R. e LIPARDY, J. — 1946. Acides nucléiques et noyaux bactériens — Compt. Rend. Acad. Sci., 223: 342-344.

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 3

A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE MASON E POWELSON AO ESTUDO DE ALGUMAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS PELA PENICILINA NA *ESCHERICHIA COLI**

POR

M. A. TEIXEIRA DA SILVA

2.º Assistente da Faculdade de Medicina do Porto

Mason e Powelson (1) mostraram que a incorporação de altas concentrações de gelatina no meio de montagem permitia uma boa evidenciação dos corpos cromatínicos de bactérias vivas observadas com o microscópio de contraste de fase. Por este processo, aqueles Autores seguiram a divisão nuclear na *E. coli* e no *B. cereus*.

Aplicámos esta técnica ao estudo de algumas alterações morfológicas induzidas pela penicilina na *E. coli*.

(*) Um resumo deste trabalho foi apresentado no «XXVI Congresso Luso-Espanhol para o Progresso das Ciências» (8.ª Secção), realizado no Porto de 22 a 26 de Junho de 1962.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizámos a *E. coli* estirpe n.º 8196 da N.C.T.C. de Londres, cultivada por períodos sucessivos de 24 horas em «Brain Heart Agar» (Difco) a 37º C.

A acção da penicilina foi seguida em microculturas realizadas pela técnica de Knaysi (2) mantidas em observação numa platina aquecida a 37º C.

O meio de cultura utilizado foi o «Brain Heart Infusion» (Difco) adicionado de gelatina e de penicilina. A gelatina (Bacto Gelatin «Difco») foi adicionada de modo a obter-se uma concentração de 27-30 ‰, a qual permite um bom contraste dos corpos cromatínicos da bactéria em estudo quando observada nas condições a indicar. A completa dissolução da gelatina foi conseguida aquecendo a mistura a 100º C durante 2 horas. Para clarificação do meio, tendo em vista a observação em contraste de fase, este foi centrifugado, após a adição da gelatina, a 2.000 G durante 2 horas a 37º C. A penicilina (Penicilina G potássica cristalizada «Wander») foi usada em duas concentrações: 10 Unidades /ml e 100 Unidades /ml. Este antibiótico foi adicionado ao meio de cultura completo no momento de iniciar a observação. Neste meio de cultura as formas dilatadas e esféricas tomadas pela *E. coli* mantiveram-se estáveis, mesmo sem adição de sacarose, por períodos de tempo até 18 horas.

As microculturas foram inoculadas com a estirpe indicada com 1,5 a 2 horas de incubação a 37º C em «Brain Heart Agar» (Difco) e observadas durante várias horas na platina aquecida montada num microscópio «Wild» com o seguinte equipamento óptico: condensador de fase, de longa distância focal; objectiva Fluotar de fase, de A. N. 1,30, 100×; ocular Phot 6× e câmara fotográfica II. A iluminação foi obtida com uma lâmpada de Xenon XBO-162, regulando-se para o tipo Köhler.

Utilizámos, para protecção da microcultura, 2 filtros anticaloríficos KG 1 e um filtro de protecção U.V.

As microfotografias foram obtidas com película «Recordak Micro-File» (Kodak), com a ampliação de 500 diâmetros. A ampliação dos positivos vai indicada nas legendas das figuras.

Para comparação com as observações em contraste de fase, fizemos preparações coradas a partir de culturas da mesma estirpe bacteriana no mesmo meio adicionado de «Bacto-agar» (Difco) e na presença das mesmas concentrações de penicilina que as descritas anteriormente. Estas preparações foram coradas, tendo em vista a evidenciação dos corpos cromatínicos, pela técnica de Piéchaud (3). Os pormenores de fixação e coloração, o equipamento óptico utilizado e a técnica usada para as microfotografias destas preparações vêm descritos em outro trabalho (4).

RESULTADOS

Nas figuras A, B, e C estão documentadas as sequências de algumas alterações morfológicas induzidas pela penicilina na *E. coli* durante as primeiras horas de actuação, segundo a técnica descrita, que corresponde à de Mason e Powelson (1). Estas sequências foram fotografadas até à obtenção de formas dilatadas e filamentosas, induzidas por baixas concentrações de penicilina, e de formas esféricas — esferoplastos (Brenner e col. (5)), induzidas por concentrações mais altas do antibiótico. Assim se pôde apreciar o comportamento dos corpos cromatínicos durante aqueles períodos de tempo.

Das observações feitas, de que as microfotografias apresentadas são exemplos representativos, podemos salientar:

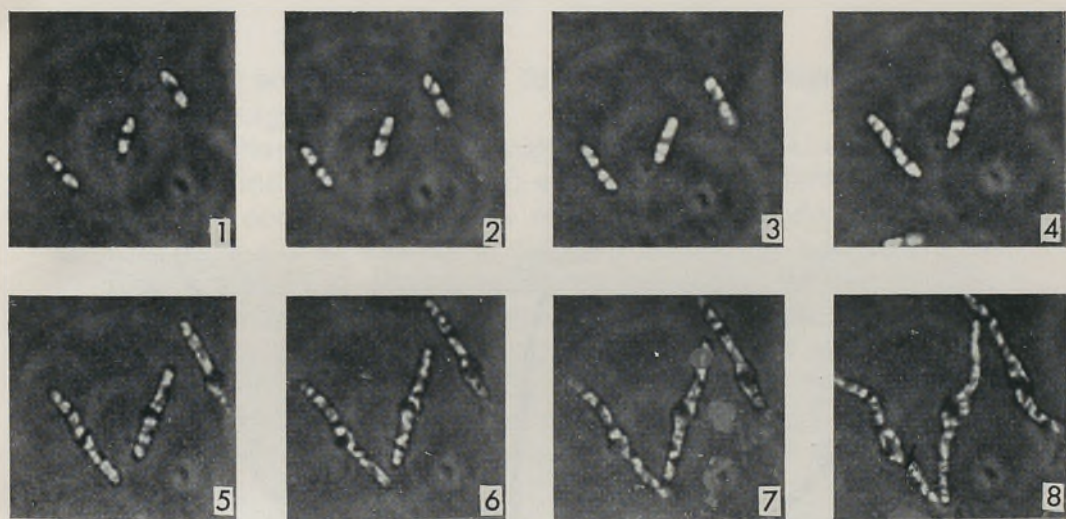
1 — Nas alterações referentes à acção de 10 Unidades de penicilina por mililitro: que a dilatação produzida nas formas filamentosas se localiza na zona em que iria for-

FIGS. A, B e C — CONTRASTE DE FASE. OS CORPOS CROMATÍNICOS APARECEM EM CLARO.

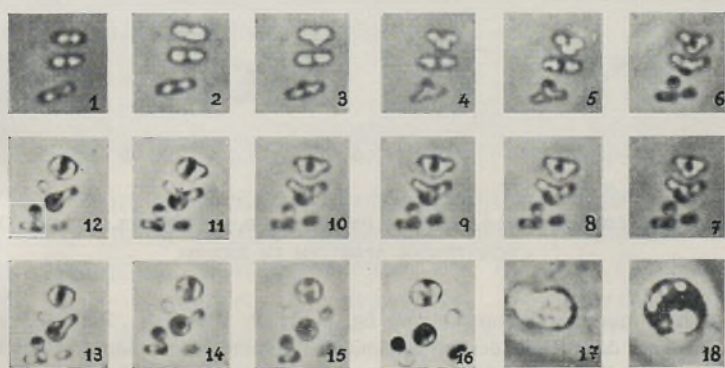
Fig. A — Meio com 30 % de gelatina. *E. coli* cultivada em presença de 10 Unidades /ml de penicilina. 1 — no começo da incubação. Aspecto normal. 2-8 — fotografias obtidas durante um período de crescimento de 4 h. e 15 min. em presença do antibiótico. Ampliação 2.000×.

Fig. B — Meio com 27 % de gelatina. *E. coli* cultivada em presença de 100 Unidades /ml de penicilina. 1 — aspecto normal, no começo da incubação. 2-16 — sequência da formação dos esferoplastos durante 195 min. 17 — às 17 horas. 18 — às 18 horas. Esferoplastos em vacuolização. Ampliação 2.000×.

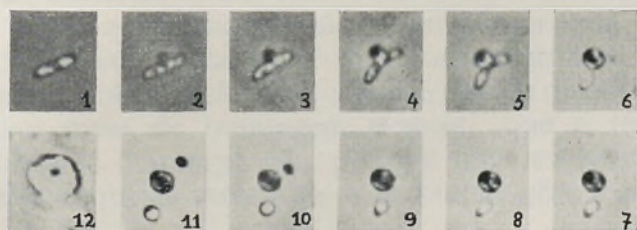
Fig. C — Meio com 27 % de gelatina. *E. coli* cultivada em presença de 100 Unidades /ml de penicilina. 1 — aspecto normal, no começo da incubação. 2-11 — formação do esferoplasto, durante um período de 195 min. 12 — às 17 horas. Ampliação 2.000×.



A



B



C

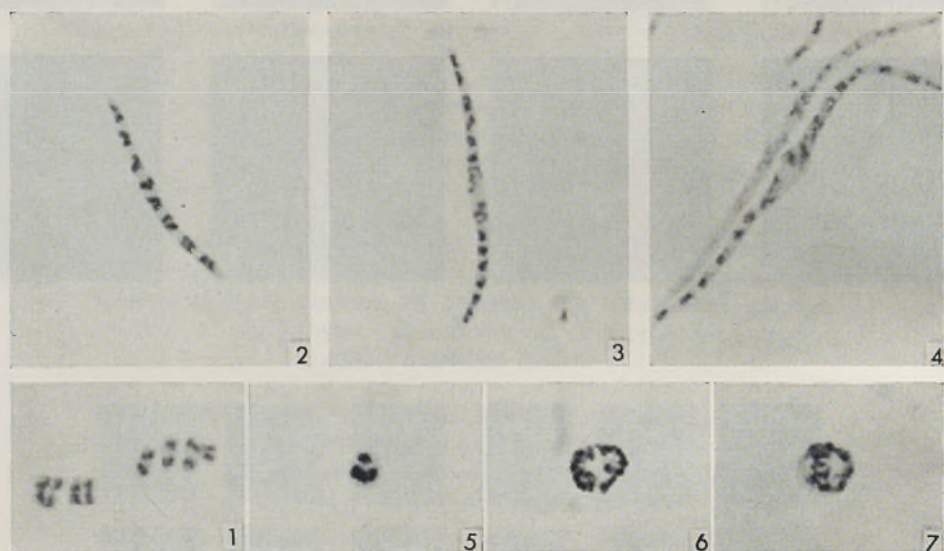


FIG. D — COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE PIÉCHAUD. FUNDO CLARO. OS CORPOS CROMATÍNICOS APARECEM EM ESCURO.

- 1 — Células normais; comparar com fig. A, 1; B, 1 e C, 1. 2-4 — *E. coli* em presença de 10 Unidades /ml de penicilina durante um período de 4 horas. Comparar com fig. A, 5-8. 5-7 — *E. coli* cultivada em presença de 100 Unidades /ml de penicilina, durante um período de 5 horas. Comparar com fig. B, 13-17 e fig. C 7-12. Ampliação 3.000×.

mar-se o septo da divisão da célula, como Duguid (6) já havia sugerido.

2 — Nas alterações referentes à acção de 100 Unidades de penicilina por mililitro: *a*) que nas células utilizadas, a dilatação começa também na zona de formação do septo. Lederberg (7) e Murray e col. (8), sugeriram que esta zona é a mais sensível à acção da penicilina; *b*) que os restos bacilares que se desprendem do esferoplasto em formação contêm material cromatínico; *c*) que o material cromatínico dos esferoplastos provém de mais que um corpo cromatínico do bacilo que o originou; *d*) que o material cromatínico dos esferoplastos aumenta durante o período de observação.

Não esteve na finalidade deste trabalho estudar a evolução ulterior das formas descritas.

Na figura D pode ver-se o aspecto obtido com a coloração dos corpos cromatínicos da mesma estirpe tratada nas mesmas condições.

DISCUSSÃO

Têm sido publicados muitos trabalhos referentes às alterações morfológicas induzidas pela penicilina em várias bactérias, nomeadamente na *E. coli* (podemos referir, por exemplo, os trabalhos de Gardner (9), Duguid (6), Shanahan e col. (10), Dienes (11), Lederberg (12), Liebermeister e col. (13), Lederberg e col. (14), Tulasne e col. (15), Hahn e col. (16)). Nesses trabalhos os seus Autores utilizaram quer a observação em contraste de fase de bactérias vivas, quer a observação de bactérias coradas. Nestas condições, não conseguiram uma visão dinâmica do comportamento dos corpos cromatínicos, uma vez que a observação em contraste de fase de bactérias vivas (sem meio de montagem especial, que a técnica que utilizámos emprega) não permite uma evidenciação satisfatória daquelas estruturas e as preparações coradas

não permitem seguir a evolução das alterações sofridas pela mesma célula bacteriana.

O método de Mason e Powelson proporcionou essa visão dinâmica. Seria interessante registá-la em microcinematografia.

*Serviço de Bacteriologia e Parasitologia
da Faculdade de Medicina do Porto.*

Director: PROF. J. MACHADO VAZ

RESUMO

Algumas alterações morfológicas induzidas pela penicilina na *E. coli* foram estudadas utilizando a técnica de Mason e Powelson. Foi usada a estirpe n.º 8196 da N.C.T.C. de Londres, com 1,5-2 horas de incubação a 37° C. A penicilina foi ensaiada em duas concentrações: 10 e 100 Unidades /ml. As alterações observadas são apresentadas em microfotografias seriadas que mostram principalmente o comportamento dos corpos cromatinicos. Fotografias de preparações coradas pelo método de Piéchaud são incluídas para comparação.

SUMMARY

Some morphological changes induced by penicillin in *E. coli* were studied by means of the Mason and Powelson's technique. The strain n.º 8196 of the N.C.T.C. of London with an incubation of 1.5-2 hours at 37° C was used. Penicillin was used in two concentrations: 10 and 100 U./ml. The observed changes are presented through serial micrographs, showing mainly the behaviour of chromatin bodies. Micrographs of preparations stained by Piéchaud's method are included for comparison.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — MASON, D. J. e POWELSON, D. M. — The nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. *J. Bact.*, 71, 474-479, 1956.
- 2 — KNAYSI, G. — A photomicrographic study of the rate of growth of some yeasts and bacteria. *J. Bact.*, 40, 247-253, 1940.
- 3 — PIÉCHAUD, M. — La coloration sans hydrolise du noyau des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 86, 787-793, 1954.
- 4 — TEIXEIRA DA SILVA, M. A. — Possibilidades do método de coloração de Piéchaud em citologia bacteriana (*Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis*, vol, xxxv, trab. 2).
- 5 — BRENNER, S.; DARK, F. A.; GERHARDT, P.; JEYNES, M. H.; KANDLER, O.; KELLENBERGER, E.; KLIENEBERGER-NOBEL, E.; MCQUILLEN, K.; RUBIO-HUERTOS, M.; SALTON, M. R. G.; STRANGE, R. E.; TOMCSIK, J. e WEIBULL, C. — Bacterial protoplasts. *Nature*, 181, 1713-1715, 1958.
- 6 — DUGUID, J. P. — The sensitivity of bacteria to the action of penicillin. *Edinburgh Med. J.*, 53, 401-412, 1946.
- 7 — LEDERBERG, J. — Mechanism of action of penicillin. *J. Bact.*, 73, 144, 1957.
- 8 — MURRAY, R. G. E.; FRAMCOBE, W. H. e MAYALL, B. H. — The effect of penicillin on the structure of Staphylococcal cell walls. *Canad. J. Microbiol.*, 5, 641-648, 1959.
- 9 — GARDNER, A. D. — Microscopical effect of penicillin on spores and vegetative cells of bacilli. *Lancet*, I, 658-659, 1945.
- 10 — SHANAHAN, A. J. e TANNER, F. W. — Further studies on the morphology of *Escherichia coli* exposed to penicillin. *J. Bact.*, 55, 537-544, 1948.
- 11 — DIENES, L. — The development of *Proteus* cultures in the presence of penicillin. *J. Bact.*, 57, 529-546, 1949.
- 12 — LEDERBERG, J. — Bacterial protoplasts induced by penicillin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 42, 574-577, 1956.
- 13 — LIEBERMEISTER, K. e KELLENBERGER, E. — Studien zur L-form der bakterien. I. Die umwandlung der bazillären in die globuläre zellform bei *Proteus* unter einfluß von penicillin. *Z. Naturforsch.*, 11 b, 200-206, 1956.

- 14 — LEDERBERG., J. e St. CLAIR, J. — Protoplasts and L-type growth of *Escherichia coli*. J. Bact., 75, 143-160, 1958.
- 15 — TULASNE, R. e VENDRELY, C. — L'évolution de l'appareil nucléaire du *Proteus* au cours du passage de la forme bactérienne normale à des formes géantes sous l'influence de la pénicilline. Schweiz. Z. Path. Bakt., 20, 397-403, 1957.
- 16 — HAHN, F. E. e CIAK, J. — Penicillin-induced lysis of *Escherichia coli*. Science, 125, 119-120, 1957.

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 4

BREVE NOTA SOBRE UMA ANOMALIA ESQUELÉTICA DA MÃO

POR

ARMANDO ANTHÉMIO MACHADO SIMÕES DE CARVALHO
(Professor Extraordinário da Faculdade de Medicina)

O acaso proporcionou-nos a observação de uma anomalia esquelética da mão que publicamos por ser pouco frequente.

Trata-se de um considerável encurtamento do 3.º metacárpico da mão direita, conforme se vê nas Figs. 1 e 2.

Como resultado do encurtamento do 3.º metacárpico, sucede que quando os dedos estão em extensão, parece haver encurtamento do dedo médio (Fig. 3), e quando os dedos estão em flexão nota-se que a 3.ª articulação metacarpo-falangiana se faz bastante mais acima do que o habitual (Fig. 4).

Esta anomalia verifica-se numa aluna de uma escola superior de Coimbra. Trata-se de M.M.G.F., de 20 anos de idade, solteira, natural de Catumbela (Angola), residente em Coimbra há seis anos.

Da sua anamnese remota regista-se que seus pais são primos direitos, que tem duas irmãs, uma mais nova

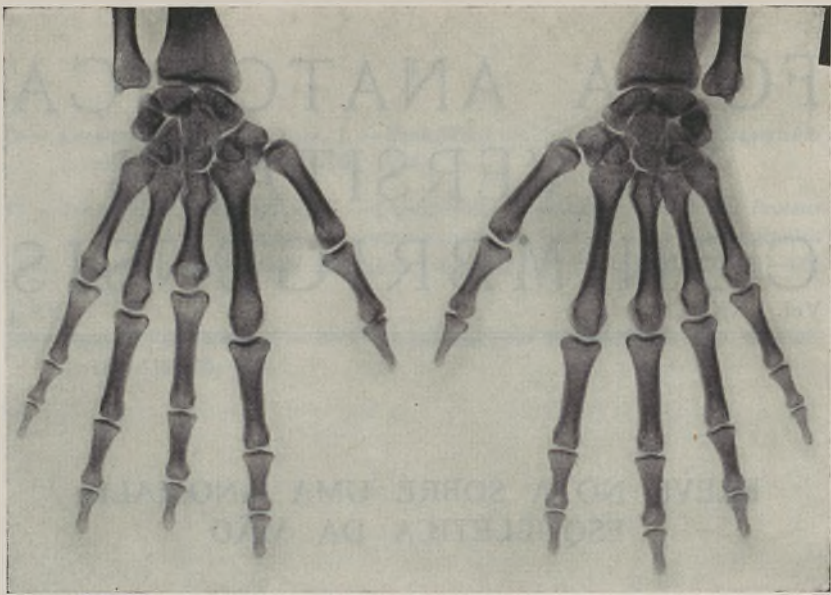


FIG. 1 — Nítido encurtamento do 3.º metacárpico da mão direita.



FIG. 2 — Radiografia de perfil.

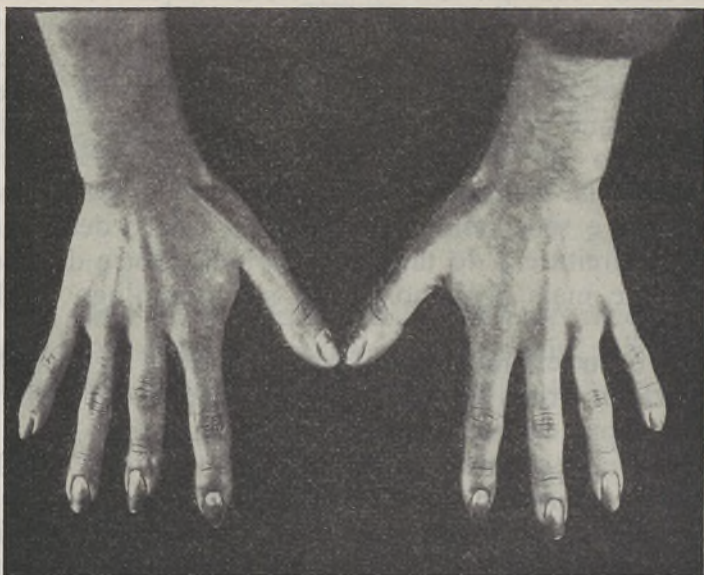


FIG. 3 — Aparente encurtamento do dedo médio da mão direita.



FIG. 4 — Mão direita com os dedos em flexão.

outra mais velha que ela, ambas normais, que teve sarampo e varicela quando criança, e que desde os dois anos de idade sofre de asma. Aos dezassete anos, após os necessários testes de alergia, iniciou o tratamento de dessensibilização que não levou a termo por razões estranhas à evolução da doença. Não obstante, experimentou consideráveis melhoras. Por volta dos cinco anos de idade, ela e seus familiares, notaram que o dedo médio da mão direita era do tamanho do indicador e do anelar, e bastante mais pequeno que o seu homólogo do lado esquerdo.

Vive perfeitamente conformada com a deformidade, e à parte as crises de asma que de quando em quando a afligem, goza de boa saúde e de boa disposição.

Não encontramos na bibliografia que nos foi dado consultar, exemplar que se sobreposesse a este, ou que tão pouco se assemelhasse. Nem no precioso livrinho de Pires de Lima «As anomalias dos membros nos portugueses» nem nas muitas comunicações dispersas no «Arquivo de Anatomia e Antropologia» da Faculdade de Medicina de Lisboa encontramos referência a um solitário encurtamento do 3.^o metacárpico.

Pela escassês de referências bibliográficas admitimos a raridade do caso, e daí o interesse da sua publicidade.

Trabalho do Laboratório de Anatomia Normal e do centro de Estudos Morfológicos da Faculdade de Medicina de Coimbra, subsidiado pelo Instituto de Alta Cultura.

Director: Prof. MAXIMINO CORREIA.

RESUMO

O Autor regista um caso de acentuado encurtamento do terceiro metacárpico da mão direita num indivíduo do sexo feminino de vinte anos de idade.

RÉSUMÉ

L'Auteur enregistre un cas d'accentué raccourcissement du troisième métacarpien de la main droite, chez une personne du sexe féminin âgé de vingt ans.

SUMMARY

The author records a case of marked shortening of the third metacarpal bone of the right hand in an individual of the female sex of twenty years of age.

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 5

NOTA PRÉVIA SOBRE O ESTUDO DOS CROMOSOMAS HUMANOS

POR

ARMANDO ANTHÉMIO MACHADO SIMÕES DE CARVALHO
(Professor Extraordinário da Faculdade de Medicina)

e

MARIA ISABEL COELHO DE OLIVEIRA MALAQUIAS
(2.º Assistente da Faculdade de Medicina)

No prosseguimento do nosso plano de estudo, damos hoje uma breve nota acerca do cariotipo humano.

Com efeito, começamos por ensaiar a coloração dos cromosomas gigantes da «*Drosophila melanogaster*» pela fucsina fenicada de Carr e Walker (1). Depois fizemos o estudo do cariotipo do «*Lepus cuniculus*» a partir da medula óssea (2).

(1) A coloração dos cromosomas gigantes da *Drosophila* pela fucsina fenicada de Carr e Walker. *Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis*, vol. XXXV, N.º 3.

(2) Contribuição para o estudo do cariotipo do «*Lepus cuniculus*». *Folia Anatomica Universitatis Conimbrigensis*, vol. XXXV, N.º 9.

Desta maneira pois, adquirimos aquele mínimo de experiência necessário para abordarmos o estudo do cariotipo humano, nosso verdadeiro objectivo.

Desnecessário será encarecer o interesse do estudo da citogenética na sua aplicação à genética médica. É à custa do estudo do cariotipo que o laboratório de genética pode informar o clínico do sexo do doente no caso de hermafroditismo ou de pseudo-hermafroditismo. É à custa do estudo do cariotipo do doente que o geneticista pode negar ou afirmar o mongoloidismo, o síndrome de Turner ou o síndrome de Klinefelter. É pois muito grande a contribuição que um serviço de citogenética pode dar para o estudo de síndromas em que se ponha em dúvida o carácter genético.

Trata-se porém dum estudo muito delicado que carece de toda a prudência na interpretação dos resultados, sobretudo quando em presença de alterações da forma dos cromosomas, alterações do número, ou mesmo em casos de mosaicismo, tendo sempre presente que a multiplicação celular se obtém em meios artificiais. São muitas, com efeito, as causas de erro. Há que as eliminar para a técnica ser segura e portanto de confiança. Requerer pois uma larga experiência. E só depois poderemos abrir as portas do nosso modesto Laboratório de Biologia Médica à clínica hospitalar.

A nota prévia que hoje publicamos apenas tem em mira mostrar que das técnicas experimentadas por outros autores e por nós repetidas e algumas vezes modificadas, a que a seguir descrevemos foi a que nos deu melhores resultados; maior número de células em profase tardia e metafase com cromosomas suficientemente dispersos.

As nossas primeiras observações sobre o cariotipo humano, insidiram sobre os leucócitos do sangue periférico, embora seja nossa intenção estudar simultaneamente, para confirmação, o cariotipo em células da pele e das aponevroses, por exemplo.

TÉCNICA

1) — Colher, por punção venosa, 10-15 c.c. de sangue, numa seringa previamente humedecida com heparina. Misturar bem, e passar o sangue para um tubo de ensaio.

2) — Juntar 0,25 c.c. de Fito-hemaglutinina (1), misturar bem, deixar actuar durante 45 minutos, e depois arrefecer o tubo a 4-5 graus C.

3) — Centrifugar a 400 rotações por minuto durante 10 minutos.

4) — Passar o plasma para outro tubo com o auxílio de uma pipeta de Wintrobe.

5) — Centrifugar de novo, mas agora a 2.000 rotações por minuto durante 3-4 minutos e decantar.

6) — Fazer nova suspensão celular com 20 % de plasma e 80 % de meio 199 (2) ao qual previamente se havia adicionado 500 U.I. de penicilina e 500 mcg. de estreptomocina por milímetro cúbico do meio. A concentração celular deverá ser de $1-2 \times 10^6$ células por ml..

7) — Distribuir por tubos de ensaio (5 c.c. em cada), rochá-los e colocá-los na estufa a 37,5 graus c., em posição quase horizontal, durante 4 dias.

8) — Juntar a cada tubo com 5 c.c. de meio e plasma, 0,5 c.c. de um soluto tamponizado de colcemid a 1 mg. % e misturar bem. Deixar actuar durante 6 a 18 horas na estufa a 37 graus.

9) — Centrifugar a 1.500 rotações por minuto durante 5 minutos. Decantar e juntar soluto hipotónico (1 parte de soluto de Hank's para 9 partes de água destilada).

(1) Bacto-Phytohemagglutinin M preparada segundo o método de Rigas e Osgood e fornecida pela casa Difco.

(2) T C Medium 199 preparado segundo a fórmula dada por Morgan, Morton e Parker e Parker, mas contendo solução salina de Hanks tamponizada em vez de solução salina de Earle como aconselham Burr, Campbell, Morgan e Nagler, Salk, Younger e Ward e Morgan, Campbell e Morton. Foi-nos fornecido pela casa Difco.

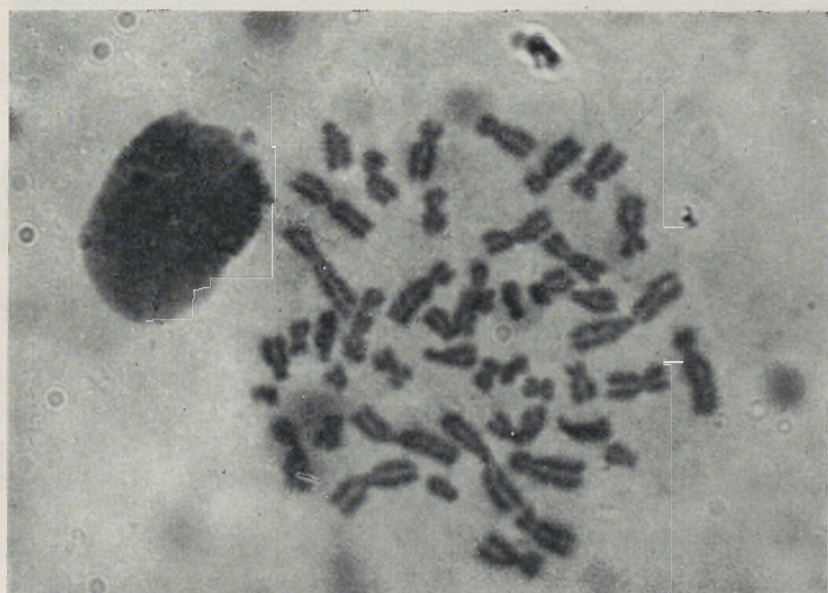


FIG. 1

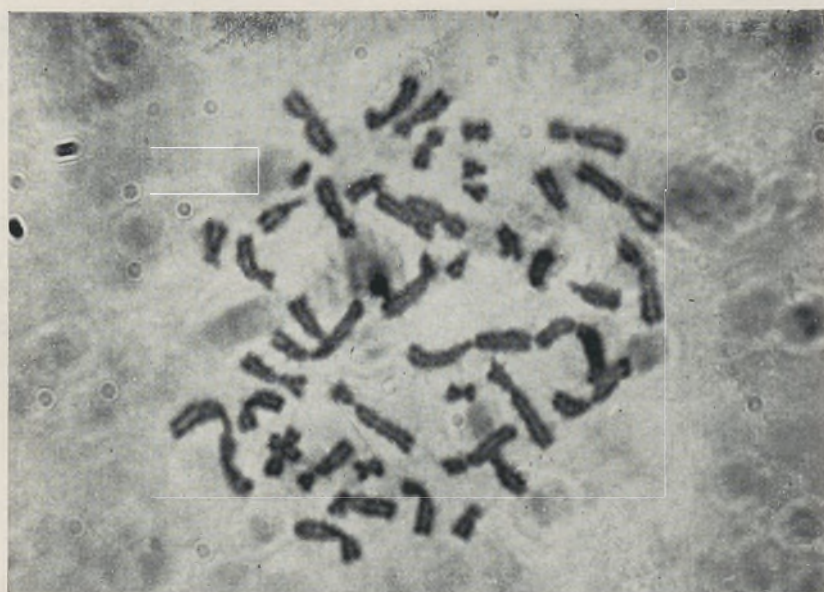


FIG. 2

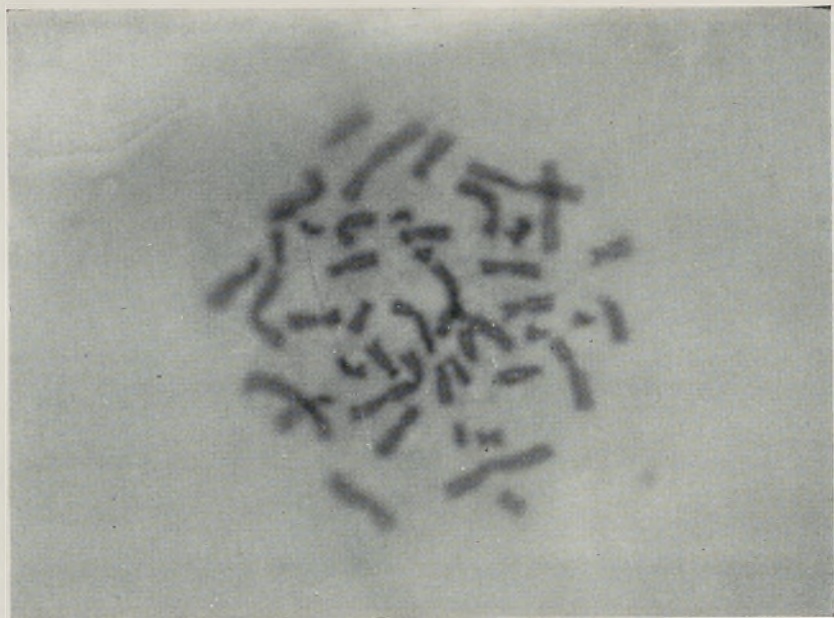


FIG. 3

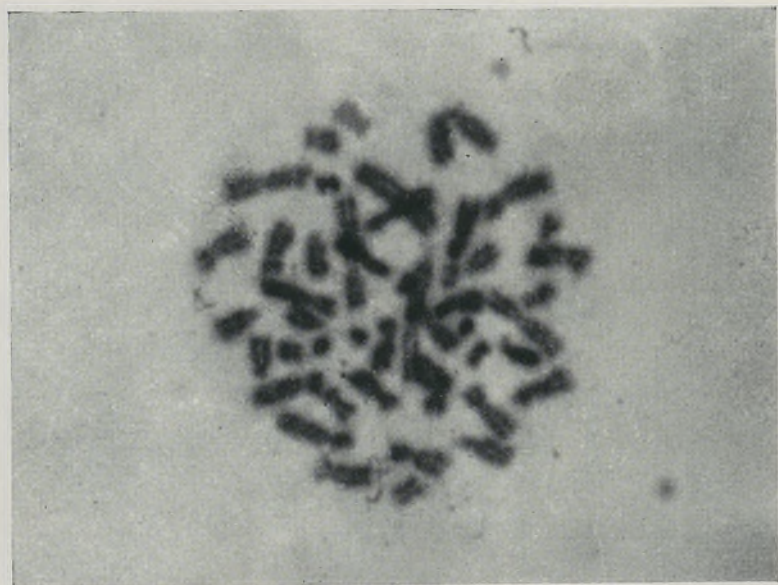


FIG. 4

Deixar actuar 15 minutos na estufa à temperatura de 37,5 graus c.

10) — Centrifugar a 1.500 rotações por minuto durante 5 minutos e decantar.

11) — Fixar bem com fixador I de Carnoy durante 10 minutos, sem desfazer a massa sedimentada.

12) — Centrifugar novamente a 1.500 rotações durante 5 minutos e decantar.

13) — Juntar umas gotas de fixador fresco, e com uma pipeta de Wintrobe ou similar, colocar sobre lâmina quimicamente limpa, duas a três gotas. Soprар sobre cada gota, suavemente, para ajudar a espalhar. Secar completa e rapidamente por agitação da lâmpada.

14) — Corar pela fucsina fenicada de Carr e Walker durante 5 minutos.

15) — Diferenciar pelo álcool absoluto, clarificar e montar em bálsamo do Canadá.

Subentendem-se, na técnica que acabamos de descrever, a esterilização prévia de todo o material utilizado, e os cuidados de assepsia no decurso de toda a manipulação. Mesmo assim, algumas vezes aconteceu contaminarem-se as preparações, e por esse facto muitas delas se perderem.

A maior parte das vezes, porém, a técnica decorreu sem precalços, e obtivemos boas preparações, algumas das quais fotografamos para ilustrar a presente publicação. São cromosomas de indivíduos do sexo masculino, sem doença aparente.

Trabalho do Laboratório de Anatomia Normal da Faculdade de Medicina de Coimbra.

Director: Prof. MAXIMINO CORREIA.

RESUMO

No prosseguimento do plano de estudos de citogenética, os autores, após breves considerações, descrevem a técnica pela qual obtiveram o cariotipo humano com que ilustram o trabalho.

São cromosomas de leucócitos de sangue periférico de um indivíduo do sexo masculino sem doença aparente.

RÉSUMÉ

Dans la suite du plan d'études de cytogénétique, les auteurs, après de rapides considérations, décrivent la technique par laquelle ils ont obtenu le cariotype humain avec lequel ils illustrent le travail.

Ce sont des chromosomes de leucocytes de sang périphérique chez une personne du sexe masculin qui n'a pas de maladie apparente.

SUMMARY

Continuing the plan of cytogenic studies the authors, after brief considerations, describe the technique by which they obtained the human karyotype which is illustrated in the work.

They are chromosomes of leucocytes of peripheral blood from an individual of the male sex without any apparent disease.

BIBLIOGRAFIA

- BEERMANN (W.) — Comment fonctionnent gènes. *Gazzeta Sanitaria* XI^e Anné, N.º 1/2, Janv.-Avr., 1962.
- CARVALHO (A. A. M. SIMÕES DE e MALAQUIAS (MARIA ISABEL C. O.) — A coloração dos cromosomas gigantes da *Drosophila* pela fucsina fenicada de Carr e Walker. *Folia Anat. Univ. Conimbr.*, Vol. XXXV, N.º 3.
- , — — Contribuição para o estudo do cariótipo do «*Lepus cuniculus*». *Folia Anat. Univ. Conimbr.*, Vol. XXXV, N.º 9.
- CLARKE (C. A.) — *Genetics for the clinician*. Oxford, 1962.
- CARR (D. H.) e WALKER (J. E.) — Carbol fuchsin as a Stain for Human chromosomes. *Stain Technology*, 36, 4, 1961.
- DARLINGTON — Chromosomes of monkeys and men. *Nature*, Vol. 175, 1955.
- — The chromosome as a physico-chemical entity. *Nature*, Vol. 176, 1955. don, 1960.
- DUNN, SINNOTT e DOBZHANSKY — *Principles of genetics*. New York, Toronto, London, 1950.
- FERNANDES (MÁRIO V.) — The development of a Human amnion strain of cells. *Texas Reports on Biology and Medicine*, Vol. XVI, N.º 1, 1958.
- FISCHER (G. A.) — Studies of the culture of leukemic cells in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 78, 1958.
- FORD (C. E.) e HAMERTON (J. L.) — A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for Mammilian chromosomes. *Stain Technology*, 31, 6, 1956.
- GAUTIER (M. LLE MARTHE) — Étude de chromosomes humains sur culture de tissus. *Bulletins et mémoires et la Société Médicale des Hopitaux de Paris*, 1959.
- Genetics and Cancer* — A collection of papers presented at the thirteenth annual symposium on fundamental cancer research (Univ. of Texas). Peter Owen L.^{aa}, London, 1962.
- HARDEN (D. G.) — A human skin culture technique used for cytological examinations. *Medical Research Council Radiobiological Research Univ. Harwell, Didcot, Bercks, Junho*, 1959.

- HSU (T. C.) e POMERAT (C. M.) — Mammalian chromosomes in vitro. II A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *J. Heredity*, Vol. 44, 1953.
- HUNGERFORD (D. A.), DONNELLY (A. J.), NOWELL (P. C.) e BECK (S.) — The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Amer. J. hum. Genet.*, Vol. XI, 1959.
- JOHN (PAUL) — Cell and tissue culture. Edinburgh and London, 1961.
- LEJEUNE (J.), TURPIN (R.) et GAUTIER (M.LLE) — Le Mongolisme, premier exemple d'aberration chromosomique humaine. *Annales de Génétique*, 1, 2, 41-49, Juillet, 1959.
- MAKINO (S.) — Water-pretreatment squash technic. *Stain Technology*, 27, 1952.
- MATTEY (ROBERT) — Les chromosomes des vertébrés. Lausanne, 1949.
- MELNYK (JOHN) e UNRAN (JOHN) — Counting chromosomes in root tips from a large population of plants. *Stain Technology*, 36, 5, 1961.
- MURRAY — Biología, Introducción al estudio general y médico. Zaragoza, 1962.
- OSGOOD (E. E.) e BROOKE (J. H.) — Continuous tissue culture of leukocytes from human leukemic bloods by application of «gradient» principle. *Blood*, Vol. X, 1955.
- e KRIPPAEHNE (M. L.) — The gradient tissue culture method. *Exp. Cell Res.* Vol. IX, 1955.
- PARIENTE (J.) — Technique d'étude des chromosomes humaines. *La France Médicale*, 24, 2, 1961.
- POSTIGLIONI GRIMALDI — Chromosomes in *Bos taurus* as revealed by prefixation treatment with hypotonic solutions. *Stain Technology*, 31, 4, 1956.
- SANDBERG, AVERY, GROSSWHITE, LOIS e GORDY — Trisomy of a large chromosome association with mental retardation. *Journal American Medical Association*, 174, 1959.
- SERRA (J. A.) — Moderna génética geral e fisiológica, Vol. I, Coimbra, 1949.
- SPARANO (B. M.) — The use of hypotonic citrate and aceto-orcein for squash preparations of Mammalian chromosome. *Stain Technology*, 36, 1, 1961.
- TAVARES (AMANDIO S.) — Um tema em foco — o cariótipo humano e a clínica. *Portugal Médico*, Fev., Vol. XLVI, 2, 1962.
- e CASTRO (G. FERREIRA DE) — O cariótipo humano. Técnica e aplicação clínica. *Portugal Médico*, Vol. XLVI, 10, 1962.

- TJIO (J. H.) and WHANG (J.)—Chromosome preparations of bone marrow cells without prior in vitro culture or in vivo colchicine administration. *Stain Technology*, Vol. 37, Jan. 1962.
- TURPIN, LEJEUNE—Les aberrations chromosomiques humaines. *Soc. de Biol.*, Nov., 1960.
- WDDINGTON (C. H.)—Introducción a la moderna genética. Barcelona, Madrid, Lisboa, Rio de Janeiro, 1956.
- WELSHONS (W. Y.), GIBSON (B. H.) and SCANDLYN (B. J.)—Slide processing for the examination of male Mammalian meiotic chromosomes. *Stain Technology*, 37, 1, Jan., 1962.

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 6

ALTERAÇÕES DA CIRCULAÇÃO LINFÁTICA NA ESTASE VENOSA (ALGUNS ASPECTOS EXPERIMENTAIS) *

por

ABEL SAMPAIO TAVARES

Professor da Faculdade de Medicina do Porto

Sendo o sistema linfático, em última análise, um divertículo do sistema venoso e seu colaborador na drenagem dos líquidos dos espaços intersticiais, compreende-se que se notem importantes modificações neste departamento quando, por qualquer circunstância se encontra modificado o curso normal do sangue nas veias dos vários sectores do organismo. É certo que a torrente linfática apenas se abre no sistema venoso ao nível dos grandes colectores da base do pescoço **, onde reina habitualmente um regime tensional favorável à aspiração da linfa. Só as causas gerais de retardamento e hipertensão venosa da grande circulação influenciariam em bloco o débito linfático. Porém, para cada um dos territórios periféricos, deve pensar-se que a estagnação venosa determina uma maior utilização das vias

* Comunicação apresentada ao IV Congresso Luso-Espanhol de Cardiologia (Porto, 1963).

** A existência de anastomoses linfático-venosas à periferia é muito discutível e improvável, na generalidade dos casos.

linfáticas pelos líquidos intercelulares e que a estase sanguínea dos gânglios regionais, a dilatação dos vasos brancos e consecutiva insuficiência das suas válvulas, as perturbações da permeabilidade vascular determinadas pelo défice nutritivo e de oxigenação decorrentes da estase, o possível compromisso directo dos linfáticos perivenosos no processo patológico das veias causador da estagnação sanguínea, os fenómenos vaso e linfo-motores, a retenção à periferia de substâncias tóxicas, são tudo factores a valorizar na interpretação fisiopatológica.

Não nos deve assim surpreender que as radículas e os troncos linfáticos se ampliem e multipliquem nos linfangiogramas ou nos cortes histológicos quando esteja prejudicado o curso normal do sangue ao longo das veias correspondentes, ou que derrames serosos acompanhem a dilatação dos linfáticos viscerais superficiais que, como mostrarei, se manifesta na estagnação venosa.

Embora não fossem difíceis de prever, os fenómenos que acabo de apontar só em épocas relativamente recentes mereceram a atenção dos investigadores neste domínio; porém, uma vez conhecidos, foram até utilizados para estudar nos diversos órgãos a distribuição topográfica dos linfáticos. Assim é que o investigador húngaro *Rényi-Vámos*, que muito se tem dedicado a pesquisas deste género em vários departamentos da economia, entende que, para estudar os capilares linfáticos, os únicos métodos aproveitáveis são os que provocam a sua dilatação, tornando-os desse modo facilmente reconhecíveis nas preparações histológicas: a laqueação dos linfáticos eferentes, ou a dos gânglios regionais, a realização de estase venosa, só ou associada à interrupção dos linfáticos, e a utilização de qualquer processo mórbido que cause edema e ectasia linfática.

Pelo que respeita às modificações linfangiográficas dos membros a seguir à estase venosa, o trabalho mais antigo de que tenho conhecimento é o de *Conti, Mussa*

e *Fonda* de 1955: comprovaram estes investigadores, após a secção da veia femoral do Cão, entre duas laqueações, dilatação e trajecto sinuoso dos linfáticos ao nível do membro correspondente. Num trabalho apresentado ao Congresso Internacional de Anatomia, reunido em Paris no mesmo ano, mostrei curiosas imagens linfangiográficas comprovativas de que obstáculos experimentalmente criados ao curso do sangue na veia cava inferior do Cão * conduziam a dilatação manifesta dos vasos brancos com ampliação da rede linfática. A obstrução foi total ou parcial, por laqueação ou constrição do vaso, mas houve sempre o cuidado de não compreender nos fios para tal utilizados, vasos linfáticos ou tecidos que os pudessem conter. No ano seguinte, *Araújo Teixeira*, trabalhando também no Centro de Estudos de Medicina Experimental, confirmou estes fenómenos e notou, de modo constante, aumento do débito da linfa no canal torácico a seguir à laqueação da veia cava inferior (no tórax e no abdómen, abaixo da desembocadura das veias renais), da veia porta e das veias supra-hepáticas, aumento esse que era acampanhado pela elevação do teor proteico da linfa.

Na Fig. 1 vemos, ao lado duma linfangiografia dos vasos iliofemorais colhida num cão normal (inj. de 2 c.c. de «Thorotrast» no gânglio poplíteo), duas outras executadas em animais da mesma espécie e com técnica semelhante, mas num dos quais praticara 14 dias antes a constrição, com dois fios, da veia cava inferior acima das veias renais e no outro a laqueação do mesmo tronco venoso entre a desembocadura das veias renais e a da veia genital direita. Repare-se neste caso na acentuadíssima

* Por comodidade direi veia cava inferior referindo-me ao Cão e empregarei também, em vez de adiante e atrás, as expressões acima e abaixo, em conexão com a localização dos fios de laqueação ou constrição colocados em torno deste tronco venoso.

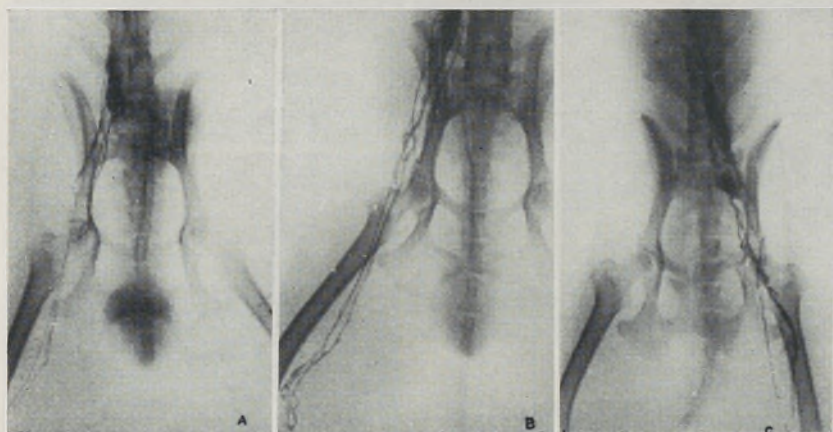


FIG. 1 — Linfangiografias dos vasos iliofemorais do Cão por inj. de 2 c.c. de «thorotrast» no gânglio poplíteo.

A — Cão normal.

B — 14 dias após a constrição do tronco da veia cava inferior acima das veias renais.

C — 12 dias após a laqueação da mesma veia acima da veia genital direita e abaixo das veias renais.

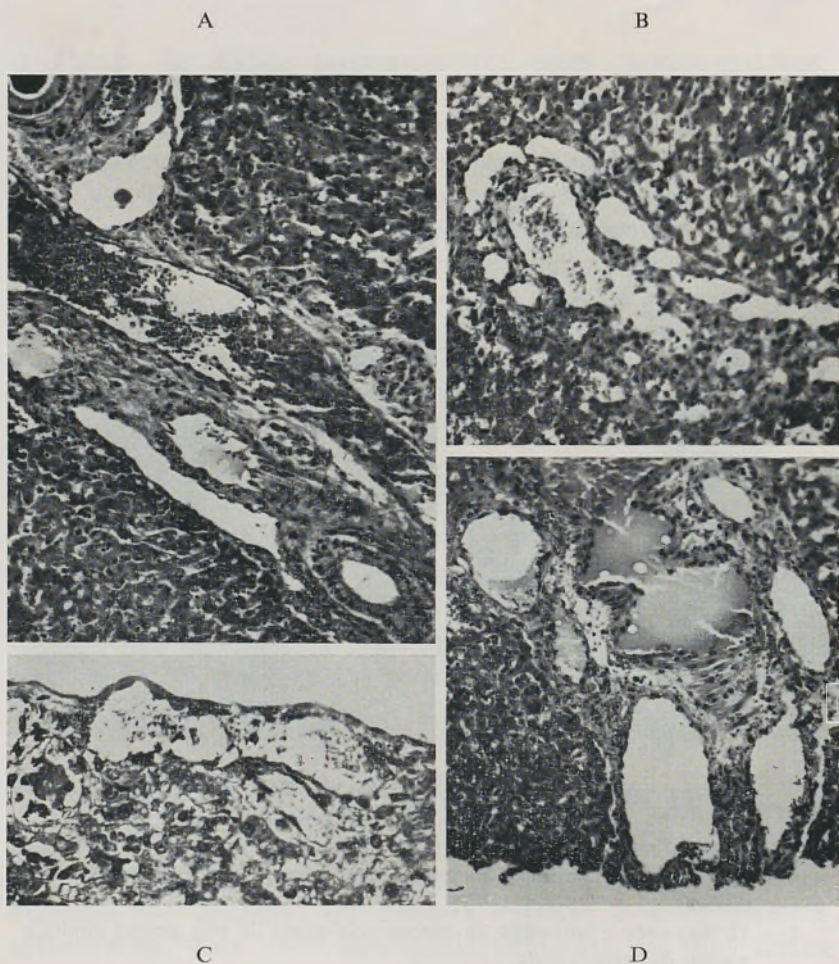


FIG. 2 — Aspectos histológicos da dilatação dos linfáticos do fígado 19 dias após a constrição de cerca de 50 % da veia cava inferior acima do diafragma.

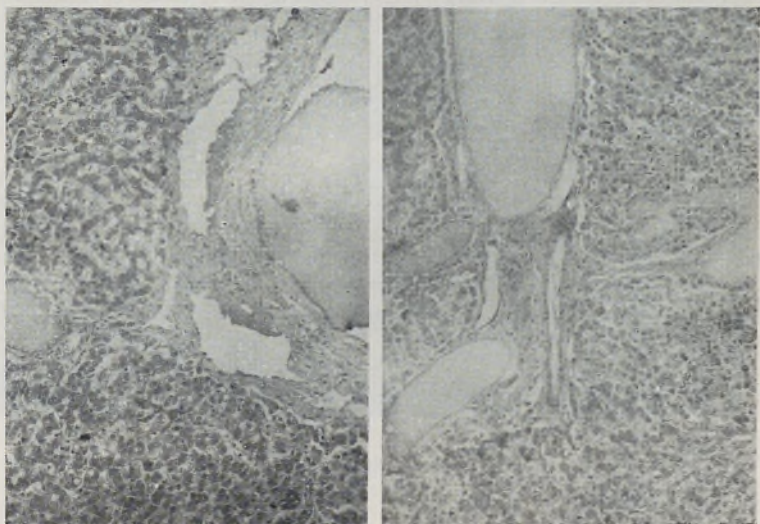
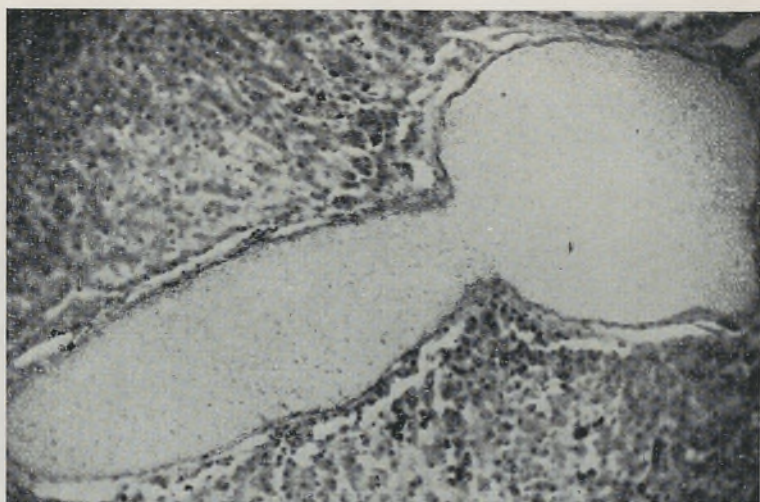
A — Rede linfática num espaço porta. Amp. 80 d.

B e D — Rede linfática em torno de veias supra-hepáticas. Amp. 80 d.

C — Dilatação linfática subcapsular. Amp. 240 d.

(*Bouin*, hemateína-eosina).

A



B

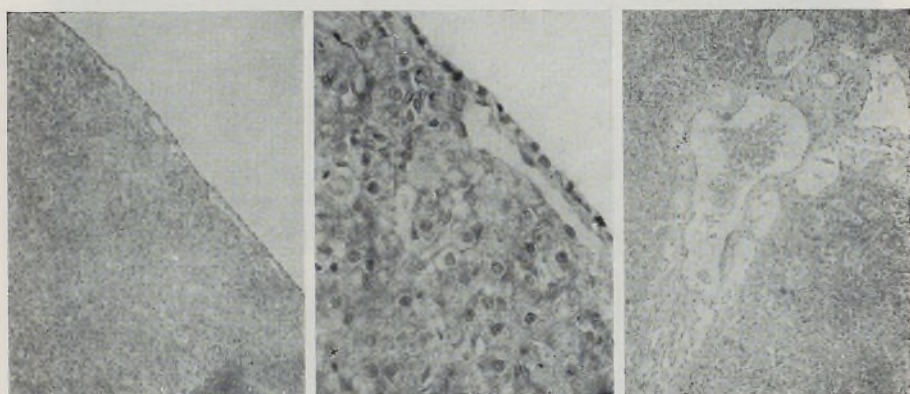
C

FIG 3 — Aspectos histológicos de dilatação linfática do fígado 20 dias após a constrição de cerca de 50% da veia cava inferior, acima do diafragma.

A e C — Dilatação linfática periportal.

B — Linfáticos da parede duma veia supra-hepática.

(*Bouin*, hemateína-eosina; amp. 80 d).



A

B

C

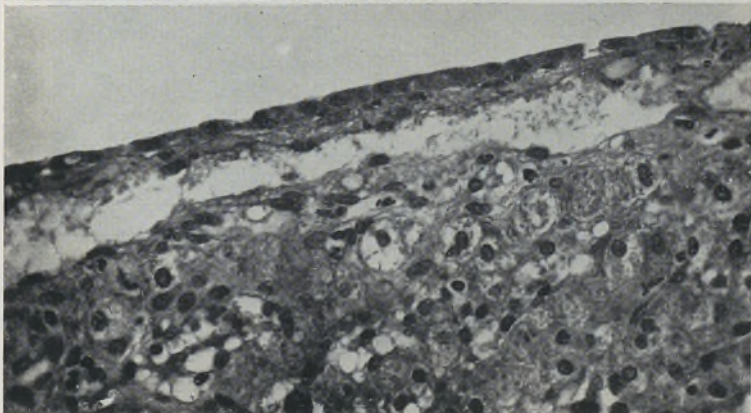
FIG. 4 — Aspectos histológicos da dilatação linfática do fígado 50 dias após a constrição de cerca de 50 % da veia cava inferior, acima do diafragma.

A e B — Dilatação linfática sub-capsular — A. Amp. 80 d.; B. Amp. 240 d.

C — Linfáticos dos espaços de *Kiernan*. Amp. 80 d.

(*Bouin*, hemateína-eosina).

A



B

FIG. 5 — Aspectos histológicos de dilatação linfática subcapsular do fígado 60 dias após a constrição de cerca de 50 % da veia cava inferior, acima do diafragma. (Bouin, hemateína-eosina).

A. Amp. 80 d.

B. Amp. 240 d.

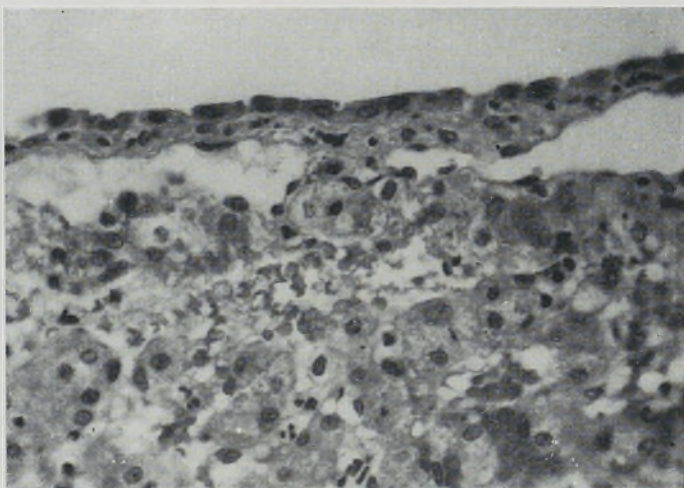
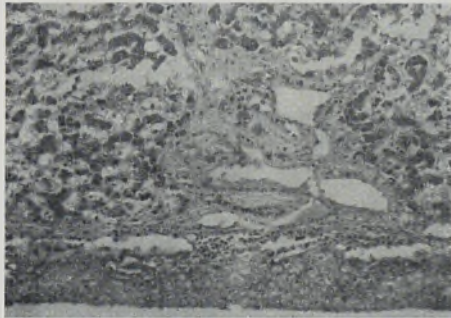
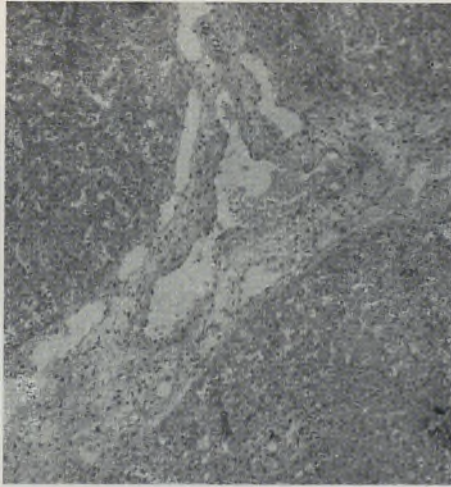


FIG. 6 — Aspecto histológico da dilatação linfática subcapsular do fígado num outro animal 60 dias após a constrição de cerca de 50 % da veia cava inferior acima do diafragma.

(Bouin, hemateína-eosina; amp. 240 d).

A



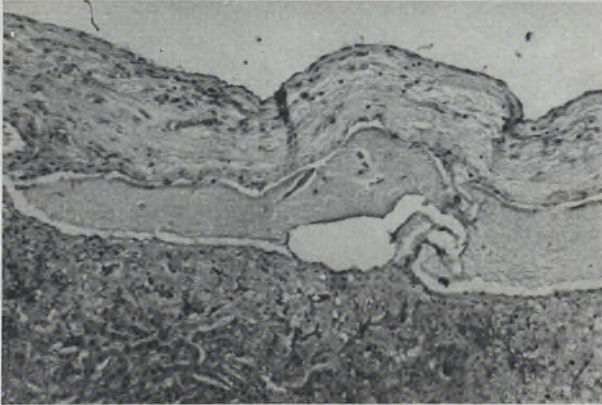
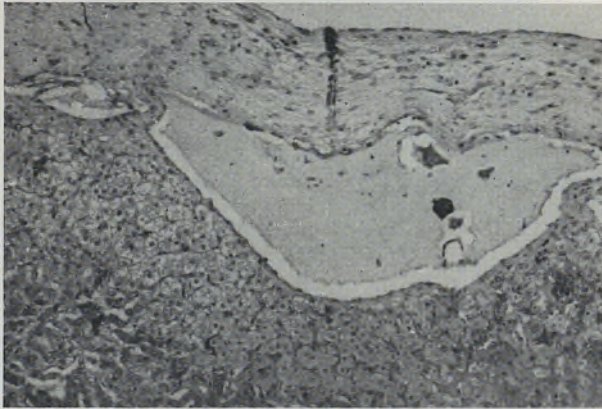
B

FIG. 7

- A — Dilatação linfática dum espaço de *Kiernan*, 60 dias após a constrição de cerca de 50 % da veia cava inferior acima do diafragma.
- B — Espessamento da capsula de *Glisson* e dilatação linfática subcapsular num cão sacrificado 34 dias após o corte entre laqueações do tronco da veia porta e 94 dias após a constrição de cerca de 50 % da veia cava inferior acima do diafragma.

(*Bouin*, hemateína-eosina; amp. 80 d).

A



B

FIG. 8—Linfáticos subcapsulares extremamente dilatados e espessamento da cápsula de *Glisson*, 7 meses decorridos sobre a constrição de cerca de 50% da veia cava inferior acima do diafragma. (*Bouin*, hemateína-eosina; amp. 80 d).

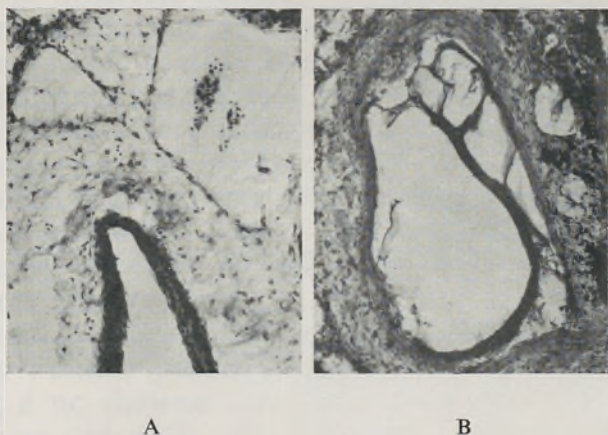


FIG. 9

- A — Edema e dilatação linfática perivascular 5 dias após a laqueação dupla das veias pulmonares.
- B — Dilatação linfática peri-venosa 28 dias decorridos sobre o corte, entre laqueações, das veias pulmonares.
- (*Bouin*, hemateína-cosina)

dilatação dos troncos linfáticos e no seu trajecto sinuoso. Note-se em ambos os animais nos quais se interferiu com o retorno venoso, o maior calibre dos vasos brancos, a mais perfeita visualização dos gânglios ilíacos e a demonstração duma rêde delicada de numerosos vasos aferentes. Conforme observei, quando publiquei estes factos, não me pareceu que os fenómenos relatados traduzissem efeito puramente passivo, apenas resultante de dificuldade de escoamento dos líquidos intersticiais para o sistema venoso. Com efeito, verificou-se que não só os linfáticos se deixavam penetrar fàcilmente pelo produto de contraste, como ainda este percorria, nos animais operados, o seu caminho ascendente com a mesma facilidade que nos testemunha, vendo-se até mais nitidamente nos primeiros colectores justavertebraes.

Estudos experimentais de *Bolton e Barnard, Grindlay* e colab. *Volwiler* e colab., mencionados por *Baggenstoss* e *Cain*, e no decurso dos quais o autores provocaram ascite por constrição da veia cava inferior acima do fígado, demonstraram a aparição de enorme dilatação dos linfáticos capsulares desse órgão e dos troncos linfáticos do pequeno epíplon, para onde parece convergir a maior parte dos linfáticos hepáticos profundos que, nos espaços porta, acompanham as ramificações das árvores biliar e vascular.

Tive ocasião de confirmar recentemente que a estase hepática consecutiva à constrição da veia cava inferior entre o fígado e o coração provoca acentuada dilatação linfática, apreciável à superfície do órgão, nos espaços de *Kiernan* e na parede dos grandes vasos venosos do sistema supra-hepático. Observaram-se simultâneamente fenómenos do mesmo tipo nos outros colectores linfáticos do abdómen e nos dos membros inferiores e, bem assim, dilatação marcada do próprio canal torácico.

Não admira, pois, que seja volumosa, de formação rápida e recidivante a ascite que se segue a esta intervenção experimental, embora a estagnação portal con-

secutiva à estase hepática seja, dentro de certa medida, corrigida, ou contrariada, pelas vias vicariantes que se observam nestas circunstâncias e que noutra parte descrevo.

Nas Figs. 2 e 3, mostra a dilatação linfática da parede de grandes veias eferentes e da dos ramos venosos porta, nos espaços de *Kiernan**, 19 e 20 dias após a constrição supradiafragmática da veia cava inferior de cerca de 50 0/0. Repare-se no primeiro caso nas veias supra-hepáticas rodeadas de riquíssimo plexo linfático, formado por vasos de grande calibre que totalmente envolvem os colectores venosos. Na Fig. 4 aprecie-se a dilatação linfática subcapsular do fígado e adventicial das veias do sistema porta envolvidas por autêntica esponja linfática, 50 dias decorridos sobre a mesma intervenção. Factos da mesma ordem foram observados aos 2 meses (Figs. 5, 6 e 7-A), aos 3 meses (Fig. 7-B) e, 7 meses decorridos, nota-se (Fig. 8), a par do espessamento da cápsula do fígado e doutras lesões hepáticas que não descreverei nesta ocasião, o extraordinário calibre e o grande número dos linfáticos subcapsulares, para além de fenómenos equivalentes que observei nos espaços porta; entre o fígado e o diafragma, no ligamento coronário, encontraram-se veias e linfáticos de grande calibre, perfeitamente identificáveis nos cortes histológicos.

A dilatação dos linfáticos do fígado aparece em condições fisiopatológicas diversas das descritas: assinalai-a quando se diminue o afluxo venoso do órgão quer consecutivamente ao estabelecimento de uma derivação porto-cava por fístula de *Eck*, quer quando se laqueia um dos ramos terminais da veia porta. Não sei explicar o fenómeno; mas há que valorizar certamente

* As preparações histológicas a que neste trabalho se faz referência, bem como as microfotografias nele reproduzidas, foram executadas no Laboratório de Histologia, por amável autorização do Ex.^{mo} Snr. Prof. M. da Silva Pinto, que muito agradeço.

o maior afluxo arterial que nessas circunstâncias se regista, a provável estase venosa por falta da *vis a tergo* portal, o déficit nutritivo, as alterações dos tecidos nobres do fígado e até talvez a ocorrência de espasmos das veias eferentes, muito verosímil no Cão, animal cujas veias supra-hepáticas possuem, como é sabido, textura muscular particularíssima e cuja acção tem sido possível desencadear em determinadas circunstâncias.

Tive também a oportunidade de demonstrar a dilatação dos vasos linfáticos pulmonares após a interrupção de algumas veias dos respectivos lobos. É o que demonstro, pelo que os linfáticos perivasculares respeita nas gravuras da Fig. 9, referentes a cortes histológicos recolhidos do parênquima interessado 5 e 28 dias após a laqueação das veias pulmonares correspondentes. Num estudo relativamente recente, *Waasbergen* e *Dankmeijer* estudaram histològicamente os linfáticos da línghula pulmonar normal e os da línghula ressecada em doentes submetidos à comisurotomia mitral, ou a outras operações cardiovasculares; ora, encontraram linfáticos muito dilatados, subpleurais especialmente, nas estenoses mitraes, o que não acontecia nas peças testemunha. Da dilatação linfática pulmonar na congestão passiva crónica, e em especial na estenose mitral, fora já apontada e estudada a sua expressão radiológica por *Davies*, *Goodwin* e *Steiner*, em 1953, e por *Levin*, em 1955. Não estranho o fenómeno, de resto idêntico ao observado noutros territórios submetidos a estase venosa: pelo que aos pulmões respeita, subscrevo a opinião de *Wyatt* e seus colab. quando afirmam que os pulmões congestionados por obstrução venosa, só podem livrar-se dos elementos do sangue aí acumulados, enquanto se não estabelece a circulação colateral, por via brônquica (tosse), por via linfática e por acção fagocitária. Sabe-se também, desde as experiências de *Warren* e *Drinker* que a compressão das veias pulmonares se acompanha de aumento do débito da linfa proveniente dos pulmões, aumento esse que ainda se mantém durante

algum tempo após se ter levantado o obstáculo circulatório. *Drinker* demonstrou também que a própria anóxia é suficiente para aumentar o débito linfático e que esse aumento cessa após a administração de oxigênio puro.

Eu creio que factos do género dos que descrevo não podem nem devem esquecer em numerosas situações patológicas cuja génese e evolução é necessário interpretar com vista à sua correcção adequada, ou de molde a evitarem-se atitudes terapêuticas inoperantes ou até contraproducentes. Assim, por exemplo, o edema crónico nos membros por alterações venosas tem de se compreender como um fenómeno complexo, de cuja fisiopatologia não pode excluir-se a participação linfática, mesmo quando não existam fenómenos sépticos na parede das veias, capazes de se estenderem aos linfáticos ou susceptíveis de os influenciar pelas toxinas filtradas através da parede vascular. *Danese* e seus colab. após investigações experimentais muito recentes, atribuíram grande importância ao factor infeccioso.

Mesmo em situações muito diversas do edema e da estase dos membros, como a insuficiência cardíaca congestiva, a pericardite constrictiva, a oclusão das veias supra-hepáticas, certas hepatopatias etc., se se tem de valorizar a estagnação linfática das vísceras, e especialmente do fígado, que nesses casos se instala: intervem de modo tão activo na eclosão e na persistência de sintomas importantes, como a ascite, que não deve também nestes casos ignorar-se a interpenetração dos fenómenos de estase venosa e estase linfática no mecanismo fisiopatológico.

*Trabalho do Centro de Estudos de
Medicina Experimental do Instituto de
Alta Cultura.*

Director: Professor Hernâni Monteiro.

RESUMO

O A. mostra aspectos de dilatação da rêde linfática que teve a oportunidade de observar após a criação de obstáculos à circulação sanguínea de retorno: laqueação ou constrição da veia cava inferior, interrupção das veias pulmonares, no Cão. Documenta-se com linfangiografias dos membros posteriores e com a apresentação de cortes histológicos do fígado e do pulmão.

RÉSUMÉ

L'A. montre des aspects de dilatation du réseau lymphatique qu'il a observés après avoir placé des obstacles à la circulation du sang dans les veines: ligature ou constriction de la veine cave inférieure, interruption des veines pulmonaires chez le Chien. Il se documente avec des lymphographies des membres postérieures et avec la présentation des coupes histologiques du foie et du poumon.

SUMMARY

Having created difficulties to blood flow in veins (ligation or constriction of inferior vena cava, ligation of pulmonary veins in dogs) the A. shows aspects of lymphatic dilatation he observed afterwards. He presents lymphatic X-Ray pictures of hind legs and histologic sections of liver and lung.

BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO TEIXEIRA, A. M. S. — Circulação da linfa e estase venosa (breve contribuição experimental), Tese de Licenciatura, Porto 1956.
- BAGGENSTOSS, A. H. e CAIN, J. C. — The hepatic hilar lymphatics of man (their relation to ascites), *New England J. Med.*, 256, 531, 1957.
- BOLTON, C. e BARNARD, W. J. — Pathological occurrences in liver in experimental venous stagnation, *J. Path. and Bact.*, 34, 701 1931.
- CONTI, T. MUSSA, L. e FONDA, G — Modificazioni della circolazione della linfa degli arti inferiore secondarie all'interruzione isolata e contemporanea di arterie e vene. *Ann. Ital. di Chir.*, 32, 513, 1955.
- DANESE, C., DIAZ, R. e HOWARD, J. — Changes in lymphatics with experimental acute thrombophlebitis, *Arch. of Surg.*, 86, 5, 1963.
- DAVIS, GOODWIN e STEINER — *BRIT. HEART. J.*, 15, 393, 1953.
- GRINDLAY, J. H., CAIN, J. C., BOLLMAN, J. L. e FLOCK, E. V. — Experimental studies of liver and thoracic duct lymph., *Minnesota, Med.*, 31, 654, 1948.
- LEVIN, B. — On the recognition and significance of pleural lymphatic dilatation, *Am. Heart. J.*, 49, 521, 1955.
- MONTEIRO, H. e TAVARES, A. S. — Circulação linfática e estase venosa, *Las Ciencias (Madrid)*, 25, 155, 1958.
- RÉNYI-VÁMOS, F. — Über einige Probleme der Lymphforschung, *Acta Morph. Acad. Sc. Hung.*, 6, 71, 1955.
- TAVARES, A. S. — Aspects anatomiques et expérimentaux de la circulation collatérale veineuse., *C. R. Assoc. Anat.*, 42, 1212, 1955.
- — Dérivation veineuse pulmonaire (étude expérimentale) . *J. Franç. Méd. Chir. Thoraciques*, 14, 255, 1960.
- , GRANDE, N. L. e NORONHA, C. K. — As obstruções da veia porta. (Contribuição experimental para o conhecimento das suas consequências), *Arg. de Pat.*, 32, 3, 1960.
- VOLWILER, W. GRINDLAY, J. H. e BOLLMAN, J. L. — Symposium on liver disease: relation of portal vein pressure to formation of ascites (Experimental studies), *Gastroenterology* 14, 40, 1950.
- WARREN, M. F. e DRINKER, C. K. — The flow of lymph from the lungs of the dog. *Am. J. Phys.*, 136, 207, 1942..
- VAN WAASBERGEN e DANKMEIJER, J. — Le caractere des vaisseaux lymphatiques dans les modifications de la circulation pulmonaire. *C. R. Assoc. Anat.*, 44, 759, 1957.
- WYATT, J. P., BURKE, D. R. e HANLON, C. R. — Morphologic studies of canin lungs after ligation of the pulmonary veins, *Am. J. Path.*, 29, 291, 1953.

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 7

ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DO EPITÉLIO INTESTINAL

I. A CÉLULA CALICIFORME DIFERENCIADA

por

MÁRIO DO NASCIMENTO FERREIRA

2.º Assistente da Faculdade de Medicina de Lisboa
Bolsheiro da Fundação Calouste Gulbenkian

No epitélio simples cilíndrico da mucosa jejunal do rato descrevem-se normalmente, ao microscópio óptico, quatro tipos fundamentais de células: as células principais ou enterocitos, as células cromo-argentafins ou de KULTSCHITZKY, as células de PANETH e as células mucosas ou caliciformes.

Referem-se ainda as pequenas células escuras—«small dark cells»—e, no fundo das glândulas de LIEBERKÜHN, as células imaturas ou indiferenciadas que se dividem activamente. Esta capacidade mitótica traduz a grande possibilidade de regeneração do epitélio intestinal, cujas células mantêm o mais estreito contacto, em especial ao nível das linhas cimentares conhecidas desde PRENANT.

A célula caliciforme, referida pela primeira vez por SCHULTZE, em 1867, tem uma forma condicionada pela localização e pelo estado funcional; em actividade, apresenta um perfil oblongo, perpendicular à superfície

dos epitélios em que se situa: epitélios simples, pseudo-estratificados e estratificados pavimentosos (MOE, 1955).

Tem duas porções: o pé ou porção basilar, que pode ser longo e estreito, ou curto e espesso; e a porção apical ou teca, cheia de muco, que por vezes se observa a ser expulso para a cavidade intestinal.

Esta célula ocupou desde sempre a atenção dos histologistas, que utilizaram os métodos mais variados de as evidenciar e estudar: o mucicarmim de MEYER, a mucihemateína, muitas cores básicas da anilina (azul de toluidina, tionina, azul policrómico de UNNA, vermelho de magenta), certos corantes ácidos (Wasserblau, verde luz), hematoxilina de DELAFIELD, reacção de BAUER, PAS, «alcian blue» 8GS de STEEDMAN, «freezing-drying», autoradiografia, microdissecção de MOE, rádio-isótopos, etc..

Mais recentemente, esta célula tão característica quando diferenciada, mereceu uma série de trabalhos com os métodos clássicos, dos quais citamos os de DAWSON (1945), SCHOFIELD (1951, 1952, 1953) e MOE (1955).

O muco foi estudado por SCHULTZE e sucessivamente por vários autores até aos trabalhos de revisão de MEYER (1945), STACEY (1946) e WERNER (1953).

Contudo a histologia clássica não resolveu todos os problemas relacionados com a célula caliciforme. A microscopia electrónica tem contribuído nos últimos anos para um seu melhor conhecimento.

*

* *

Que se sabe da ultra-estrutura da célula caliciforme?

Em 1958, POLICARD e BAUD afirmavam: «Les données de microscopie électronique concernant les cellules à mucus (cellules caliciformes) de l'intestin sont rares. En fait, les études sur les cellules à mucus ont été consacrées presque toutes à cellules des bronches». RHODIN

e DALHAMN (1956), na verdade, colheram os primeiros dados ultra-estruturais da célula caliciforme ao nível do epitélio ciliado da mucosa traqueal do rato, e apresentaram as imagens morfológicas de um possível ciclo secretório nesta célula glandular.

PALAY (1958), ao estudar a morfologia da secreção, descreveu as modificações observadas ao microscópio electrónico no aparelho de Golgi e no ergastoplasma da célula caliciforme do epitélio intestinal. TAYLOR (1959) fez uma referência sumária à célula caliciforme do duodeno de rato, descrevendo o ergastoplasma abundante, a existência de microvilosidades e a ausência de interdigitações e de «terminal-bars».

FLOREY, em 1960, estudou a expulsão do muco pela célula caliciforme do cólon de rato utilizando o óleo de mostarda dissolvido em azeite. Ao mesmo tempo, SHEARMAN e MUIR (1960) descreviam a célula caliciforme do intestino grosso do rato e referiam-se ao seu ciclo secretório.

HOLLMANN e HAGUENAU (1961) ao estudarem os polipos rectais do rato fizeram algumas observações sobre a ultra-estrutura da célula caliciforme a este nível da mucosa digestiva e chamaram a atenção para a hiperplasia e distensão do aparelho de GOLGI. Em 1962, HOLLMANN e STÂUBLI observaram a ultra-estrutura dos polipos rectais no Homem e descreveram um tipo de célula secretora com vacúolos.

MATERIAL E TÉCNICA

Utilizaram-se vinte ratos brancos normais, de ambos os sexos, de idade compreendida entre 2 e 3 meses, pesando desde 40 a 90 gramas; todos os animais estiveram isolados e mantidos em jejum durante vinte horas, e em seguida foram mortos por anestesia (clorofórmio).

Procedeu-se imediatamente à colheita de pequenos fragmentos de mucosa jejunal (jejuno proximal) que foram fixados no soluto a 1 % de tetróxido de ósmio tamponado a pH 7,2 com acetato veronal (PALADE, 1952) e incluídos em metacrilato de n-butilo segundo a técnica usual.

Os cortes realizaram-se no ultra-micrótomo de PORTER-BLUM com facas de vidro e recolheram-se em grelhas de cobre cobertas por uma delgada membrana de formvar.

As microfotografias foram obtidas com o microscópio electrónico RCA EMU3 a 100 kw e seguidamente ampliadas.

OBSERVAÇÕES PESSOAIS

GENERALIDADES — No jejuno de rato, a célula caliciforme observa-se desde o fundo das criptas de LIEBERKUHN até à extremidade das vilosidades, isolada entre as células principais ou formando grupos de duas, três ou quatro células separadas apenas por delgadas porções citoplásmicas das células vizinhas (FIG. 1).

Distinguímos dois aspectos fundamentais nas células caliciformes: as de citoplasma claro (células caliciformes claras) e as de citoplasma denso (células caliciformes escuras). Encontram-se ainda aspectos intermédios àqueles dois (FIGS. 2, 3, 4, 5).

Em cortes longitudinais ou oblíquos a célula caliciforme pode apresentar uma forma bem conhecida dos clássicos, coincidente com a descrita ao microscópio óptico; ou surgir com uma forma cilíndrica ou redonda irregular; quando no plano do corte figuram o núcleo e a teca bem desenvolvida o seu perfil tem um aspecto em alter (FIGS. 3, 4, 5, 6).

Nos cortes transversais temos sucessivamente:

a) à altura da teca, o contorno é circular, limitado externamente pela membrana celular e uma fina camada de citoplasma denso em que se observam, quase sempre, sistemas de membranas duplas do retículo endoplásmico,

que rodeiam as granulações mucosas e uma ou outra mitocôndria (FIG. 1).

b) logo acima do núcleo, em plena zona de Golgi e da formação das granulações de secreção, o perfil da célula é quadrangular, pentagonal, ovóide ou elipsiforme, e o citoplasma é denso, rico de ergastoplasma e grãos de secreção, estes na proximidade de numerosos vacúolos claros do complexo de Golgi (Fig. 7).

c) ao nível do núcleo, no seu polo superior, um corte transversal permite observar granulações mucosas, abundante ergastoplasma (grão de PALADE livres no citoplasma e aderentes a sistemas de duplas membranas paralelas) e mitocôndrias de perfil circular; se o corte for mais inferior, observa-se um citoplasma denso em relação ao das células principais vizinhas, sem grânulos de secreção, com algumas mitocôndrias e ergastoplasma; o núcleo é pequeno, de contorno circular ou irregular;

d) nos cortes abaixo do núcleo, o citoplasma pode ser claro (célula clara) ou denso (célula escura), mas sempre rico de ergastoplasma, sob a forma de pequenos sacos ou cisternas ergastoplásmicas que se anastomosam e contêm uma substância homogênea pouco osmiófila; observam-se também raras mitocôndrias por vezes em contacto com o retículo endoplásmico.

No fundo das criptas, a presença de uma figura mitótica não exclui o diagnóstico de célula caliciforme. Com efeito, observámos células em divisão com granulações semelhantes às mucosas. São conhecidas as mitoses nas células secretórias, tanto nos vertebrados como nos invertebrados (GABE e ARVY, 1961).

MEMBRANA CELULAR — A membrana celular da célula caliciforme aparece como uma linha densa, contínua, de 100-125 A° de espessura separada da célula contígua por um espaço claro de 100-150 A°.

O seu contorno é irregular e insinua-se por entre as células principais que a rodeiam, aumentando a coesão epitelial. Este facto havia sido negado por TAYLOR (1959),

que não observou também os «terminal-bars» perto da superfície livre das células caliciformes, mas que as nossas observações provam existir. Com efeito, tal como foram descritos na célula principal (PALAY e KARLIN, 1958), observa-se na célula caliciforme, um pouco abaixo do ponto de junção apical de duas células, um espessamento da membrana celular, menos separada a esse nível da célula vizinha; esta formação exoplásmica corresponde a uma especialização da superfície de contacto de células adjacentes (FAWCETT, 1958), e foi designada, em histologia, por linha cimentar (PRENANT) ou «Kittleisten» (ZIMMERMANN). Além destas formações encontram-se a níveis mais inferiores da membrana celular lateral os desmosomas.

Há que estabelecer a diferença entre a membrana apical da célula caliciforme das criptas de LIEBERKÜHN e a das vilosidades jejunais.

A superfície apical das células caliciformes das glândulas de LIEBERKÜHN apresenta uma membrana citoplásmica com raras microvilosidades menos desenvolvidas que as das células principais (FIGS. 1; 10A-B). Com a formação das granulações de secreção e a repleção tecal, o citoplasma apical é empurrado para o canal glandular, fazendo saliência entre as células adjacentes (FIG. 10 A-B), e acaba por desprender-se por distensão, seguida de rompimento, da membrana plasmática, ficando as granulações mucosas rodeadas pela membrana própria em contacto com a cavidade da glândula.

Nas células caliciformes das vilosidades, em plena actividade funcional, não se observam microvilosidades, existindo, quando muito, uma fina membrana apical em desorganização. Quase sempre, nestas células, as granulações mucosas estão em contacto directo com o lume do intestino, quer desprendendo-se, quer aderentes ainda às subjacentes (FIGS. 10 C-D). Quando a célula expulsou grande porção do produto elaborado surge uma imagem cavitária semelhante às descritas na célula mucosa da traqueia do rato (RHODIN e DALHAMN, 1956).

A porção basal da membrana plasmática assenta na membrana basilar, observando-se, por vezes, um espaço claro a separá-las, de espessura variável (até 900 Å), onde se podem observar pequenos corpúsculos densos.

NÚCLEO — O núcleo da célula caliciforme está situado no polo basilar, tanto mais perto da membrana basilar quanto mais repleto de granulações se encontra o citoplasma supra-nuclear. Apresenta-se arredondado, ovóide, achatado ou alongado e até com uma concavidade no polo superior, conforme o estado funcional da célula. Esta variação da forma nuclear é um fenómeno descrito em todos os tipos celulares que acumulam o produto de secreção no citoplasma apical.

A sua estrutura é granulosa densa; os grânulos de 150-200 Å de diâmetro apresentam-se em pequenos grupos dispersos, rodeados por outros menos densos e menores, que por vezes tomam um aspecto reticulado. Está rodeado por uma membrana ou envólucro nuclear (WATSON, 1955) constituído por duas membranas densas com uma espessura média de 150-250 Å cada uma, separadas por uma zona clara — espaço perinuclear — de espessura muito variável (125-900 Å). A membrana interna, em contacto com o nucleoplasma, apresenta algumas partículas densas aderentes de 150-200 Å. A membrana externa apresenta sempre numerosas partículas densas semelhantes e continua-se, em muitas observações, com as membranas do retículo endoplásmico, fazendo comunicar as cavidades deste com o espaço perinuclear (FIG. 9).

Os poros nucleares são de muito difícil observação na célula caliciforme. Só encontrámos poros na membrana nuclear desta célula em cortes tangenciais ao núcleo e o seu diâmetro médio era de 400 Å. Algumas imagens apresentavam continuidade entre o hialoplasma e o nucleoplasma através de pequenos canaliculos visíveis num trajecto de 0,4 μ . Correspondem aos canaliculos intranucleares de WATSON.

NUCLÉOLO — O nucléolo da célula mucosa jejunal surge no seio do núcleo como uma estrutura densa — umas vezes na região central do nucleoplasma, outras vezes à periferia, em contacto com a membrana nuclear, quer na parte superior do núcleo, quer no polo inferior. É constituído por grânulos densos de 200 A° de diâmetro, em média, dispostos de modo reticulado, entre cujas malhas há zonas claras de densidade idêntica à da «pars amorpha».

MITOCÔNDRIAS — As mitocôndrias são pouco abundantes na célula caliciforme, em relação, por exemplo, à célula principal.

Observam-se a toda a altura do corpo celular e predominam à volta do núcleo, em especial nas regiões supra e infra-nucleares. Entre o núcleo e a membrana basilar contam-se em número variável em cada corte (duas a cinco ou mais). Encontram-se também aos lados do núcleo, entre a membrana nuclear que por vezes deprimem e a membrana celular lateral.

Em células mucosas em plena actividade (teca em formação), as mitocôndrias predominam na região supra-nuclear, entre os elementos do aparelho de Golgi, do ergastoplasma e das granulações recém-formadas. É raro encontrarem-se mitocôndrias entre as granulações que constituem a teca, não sendo tão raras à sua periferia apertadas entre a membrana celular e o retículo endoplásmico.

O seu tamanho (variável) e a sua forma não diferem do que se observa nas mitocôndrias das células principais.

A matriz mitocondrial é, em algumas células, mais densa que o citoplasma. Noutras, é mais clara e a mitocôndria tem um aspecto túrgido, com maior diâmetro e sem uma orientação definida das cristas, que nesta célula, geralmente, se orientam perpendicular ou obliquamente ao eixo maior do organito.

Quando a célula se encontra com a teca formada e a excreção tem início, são raras as mitocôndrias obser-

vadas. Em certos casos são expulsas juntamente com as granulações mucosas (FIG. 10 D).

APARELHO DE GOLGI — Este organito apresenta-se muito desenvolvido na célula caliciforme diferenciada, com um aspecto hiperplásico, como verificaram anteriormente PALAY (1958) e HOLLMANN e HAGUENAU (1961).

Encontra-se geralmente situado na região supra-nuclear (por vezes justa-nuclear) entre os elementos do ergastoplasma, as granulações de secreção já formadas ou em formação e o citoplasma fundamental da célula.

A sua hiperplasia e fragmentação, aliadas à riqueza do ergastoplasma e à escassez de mitocôndrias são características constantes da célula caliciforme.

Os elementos que constituem o aparelho de Golgi nesta célula são os grupos de membranas duplas de aspecto liso, os grandes vacúolos claros e as microvesículas de conteúdo homogéneo e denso.

Nos cortes longitudinais das células, o aparelho de Golgi observa-se quase sempre situado abaixo das granulações mucosas.

Nos cortes transversais supra-nucleares evidencia-se, muitas vezes, um complexo de Golgi disposto em crescente ou semi-círculo, constituído por pares de duplas membranas paralelas e lisas e grandes vacúolos envolvidos por membranas de menor densidade electrónica. A célula fica dividida, praticamente, em duas zonas: uma externa, entre os elementos do aparelho de Golgi e a membrana celular, preenchida quase exclusivamente por cisternas ou sacos ergastoplásmicos, por vezes engorçados; e uma zona interna, rodeada pelo aparelho de Golgi e cheia de granulações mucosas de densidade variável (FIG. 7).

Na célula caliciforme com a teca bem desenvolvida os elementos golgianos rareiam e estão representados por pequenos grupos de duplas membranas lisas paralelas, que rodeiam pequenos vacúolos claros, elementos que se encontram geralmente mais afastados do núcleo.

Em algumas observações encontraram-se, entre as granulações da teca, pequenos espaços claros semelhantes a vacúolos golgianos.

ERGASTOPLASMA — A célula caliciforme, como de modo geral toda a célula glandular, apresenta formações ergastoplásmicas abundantes sob o forma de ribosomas livres no citoplasma ou aderentes a sistemas de duplas membranas paralelas dispostas, na maioria, à volta do núcleo. As mais externas continuam-se para o citoplasma apical envolvendo a região supra-nuclear.

As células de citoplasma claro, observadas tanto nas criptas como nas vilosidades, apresentam sacos ergastoplásmicos em número reduzido, que se anastomosam e dispõem por todo o citoplasma, por vezes em estreita relação com a membrana nuclear e em continuidade com ela, fazendo comunicar as suas actividades com o espaço perinuclear (FIG. 9). Na região supra-nuclear destas células há elementos do retículo endoplásmico na proximidade do aparelho de Golgi, mas não se observam imagens de continuidade entre os dois organitos. No interior dos sacos ergastoplásmicos encontra-se uma substância homogénea, pouco osmiófila, cujo aspecto se mantem seja qual for o estado funcional da célula.

As células caliciformes de citoplasma escuro, mais desenvolvidas no tamanho e estado secretório, apresentam um ergastoplasma muito abundante, que lhes confere a osmiofilia (FIGS. 3 e 4).

Nas células caliciformes com a teca bem desenvolvida o ergastoplasma é mais escasso. O retículo endoplásmico encontra-se apertado entre o produto elaborado e a parede celular mantendo ainda a sua disposição ordenada.

Algumas imagens observadas de células intensamente osmiófilas, com algumas granulações de aspecto mucoso e retículo endoplásmico dilatado e vazio, e que não foram descritas ainda, consideramo-las como células exaustas, que nos fazem lembrar as «Schmale Zellen» dos clássicos.



FIG. 1 — Glândula de Lieberkühn do jejuno de rato. Porções tecais de cinco células caliciformes separadas por células principais com prato estriado. Numa célula caliciforme (C1) observa-se citoplasma apical com uma microvilosidade. Em C2 a membrana apical, sem microvilosidades, já permitiu o contacto do muco com o lume da glândula.



FIG. 2 — Epitélio jejunal. Célula caliciforme clara. N-Núcleo; M-Mitocôndrias; AG-Aparelho de Golgi; RE-Retículo endoplásmico; Gm-Granulações mucosas.

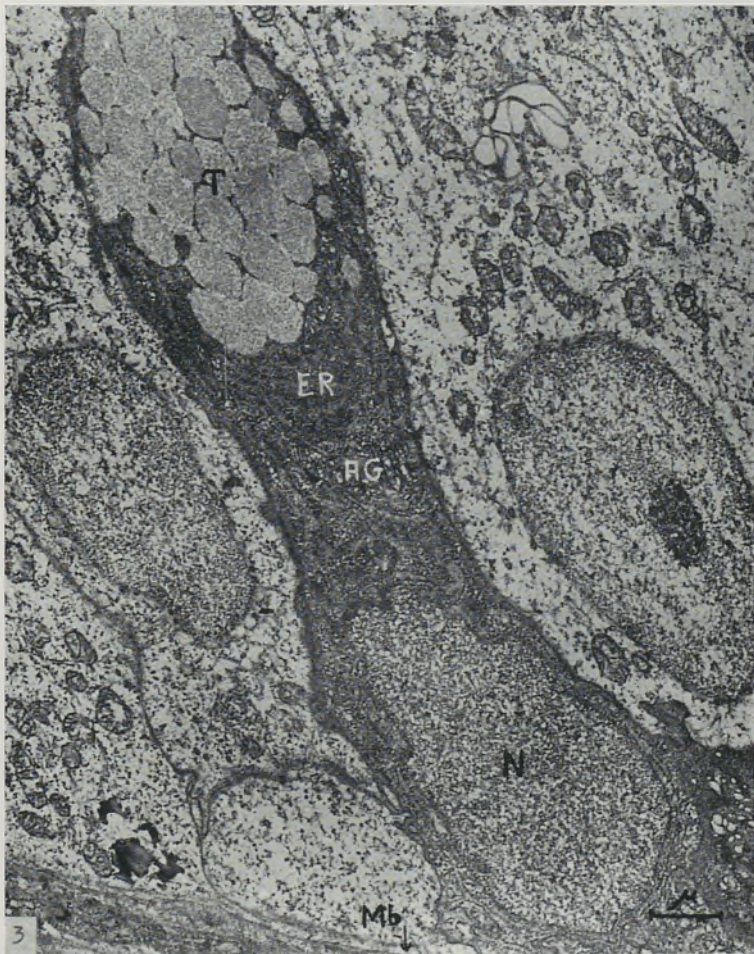


FIG. 3 — Epitélio jejunal. Célula caliciforme escura, em alter, entre duas células principais. Notar a grande riqueza ergastoplásmica, e o núcleo (N) menos osmiófilo. T-Teca, com granulações mucosas; AG-Aparelho de Golgi. ER-Ergastoplasma. Mb-Membrana basilar.

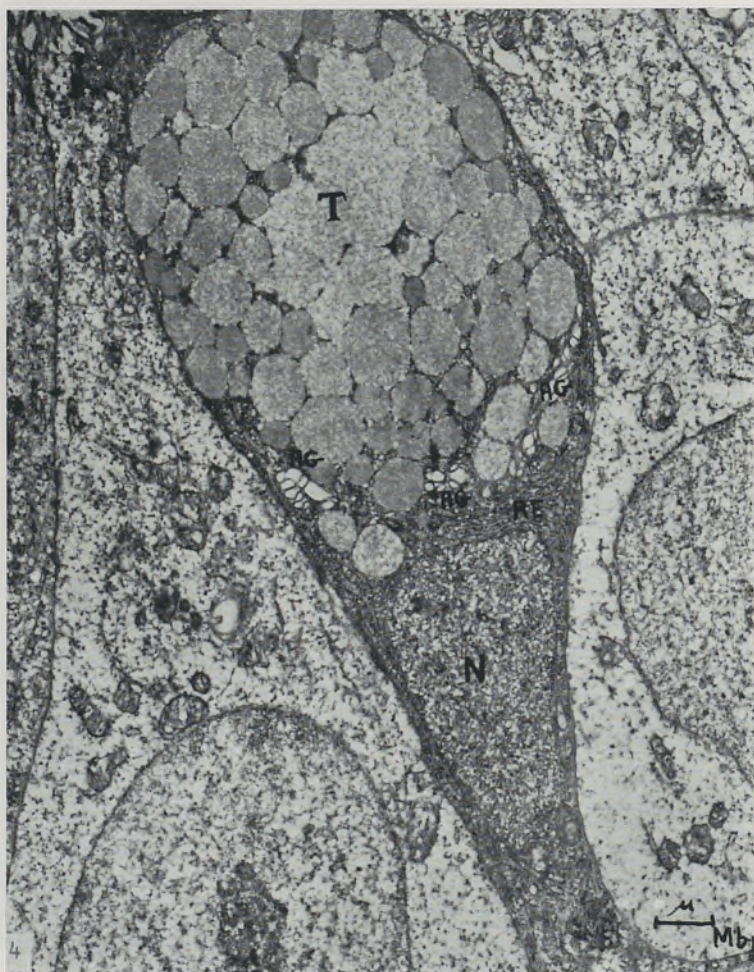


FIG. 4 — Célula caliciforme escura, em cálice, entre células principais. T-Teca bem desenvolvida, cujas granulações são de densidade variável, algumas em coalescência; AG-Aparelho de Golgi reduzido; RE-Reticulo endoplásmico; N-Núcleo; Mb-Membrana basilar.

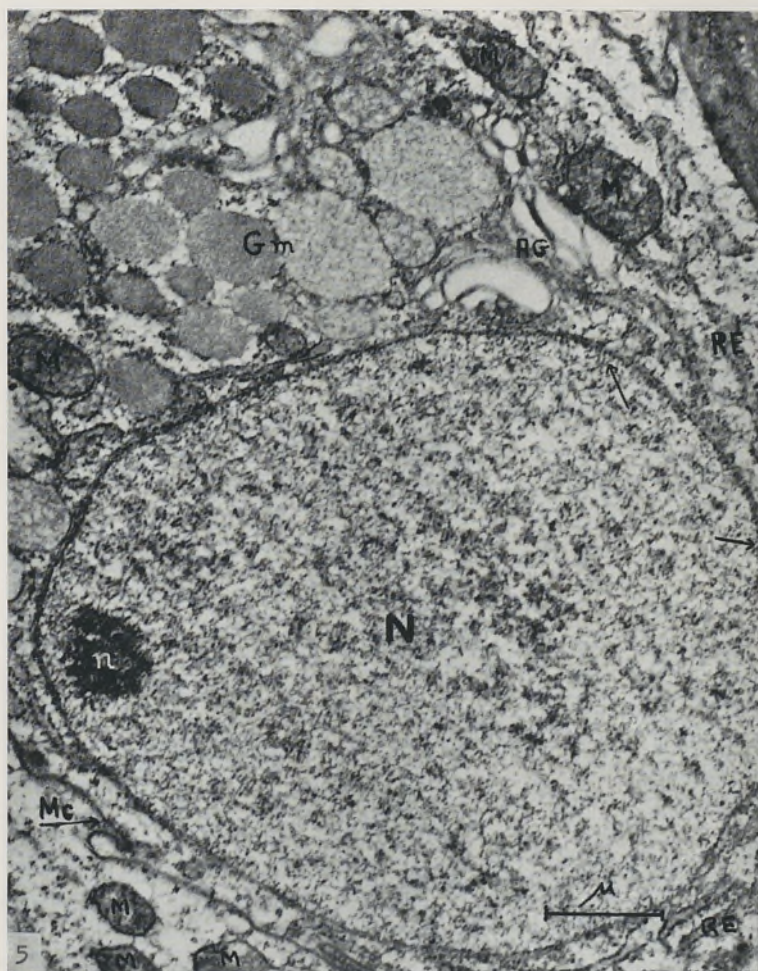


FIG. 5 — Célula caliciforme de tipo intermédio. Núcleo; n-Nucleólo; RE-Retículo endoplásmico; Gm-Granulações mucosas, de densidade variável; M-Mitocôndrias de matriz densa; AG-Aparelho de Golgi; Mc-Membrana celular. Observar a comunicação do hialoplasma com o nucleoplasma através de pequenos canáculos (↑).



FIG. 6 — Célula caliciforme (porção supra-nuclear). Notar as imagens de transição entre os vacúolos do aparelho de Golgi (AG) e as granulações mucosas (Gm); N-Núcleo; M-Mitocôndrias; RE-Retículo endoplásmico.

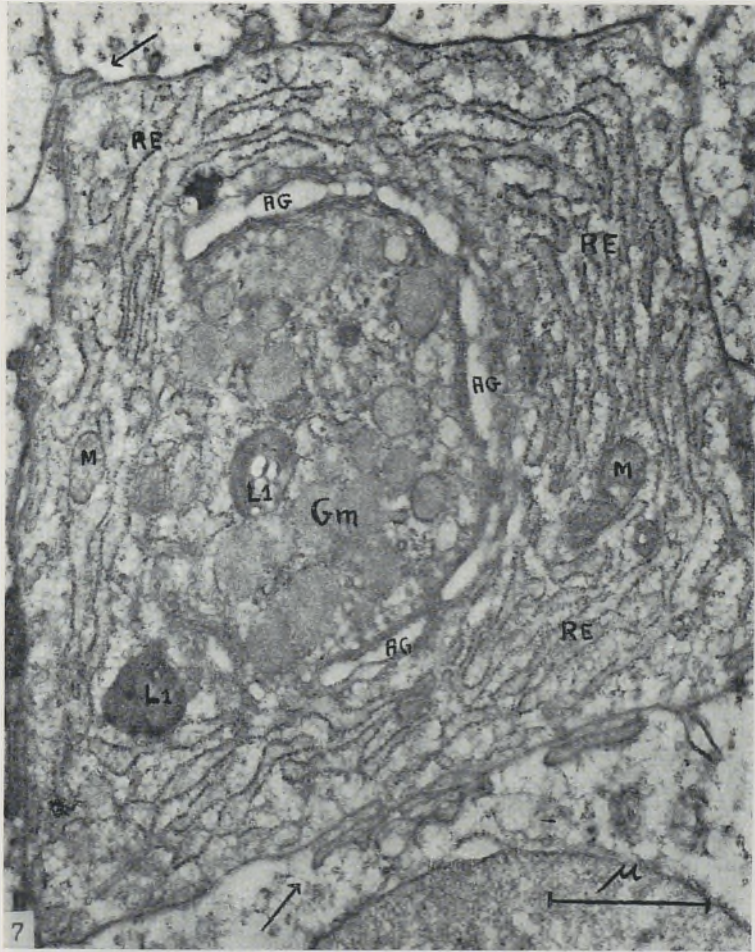


FIG. 7 — Corte transversal supra-nuclear de uma célula caliciforme. Notar a riqueza do retículo endoplásmico (RE) e do aparelho de Golgi (AG); este divide a célula caliciforme em duas zonas (externa e interna), a interna cheia de granulações mucosas (Gm); M-Mitocôndrias; L1-Grânulos densos, semelhantes aos descritos na célula mucosa da traqueia do rato (RHODIN e DALHAMN). Notar também a disposição da membrana celular (\uparrow), o que aumenta a coesão epitelial.

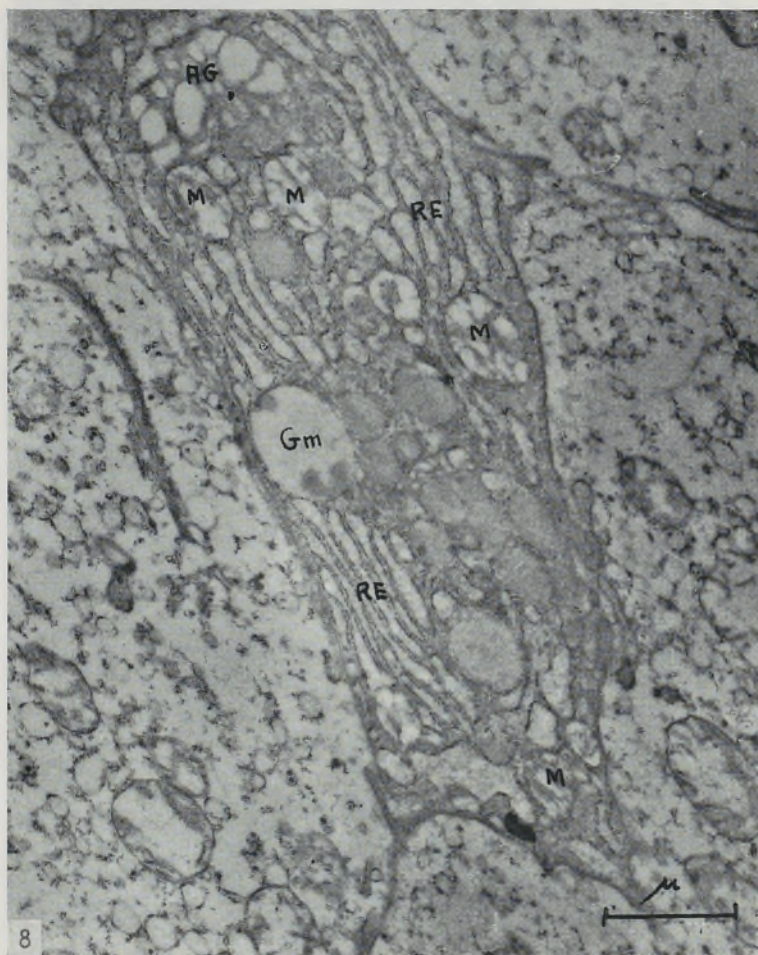


FIG. 8 — Corte supra-nuclear de uma célula caliciforme. As granulações mucosas (Gm) são exteriores em relação às cisternas do retículo endoplásmico (RE); M-Mitocôndrias; AG-Aparelho de Golgi.

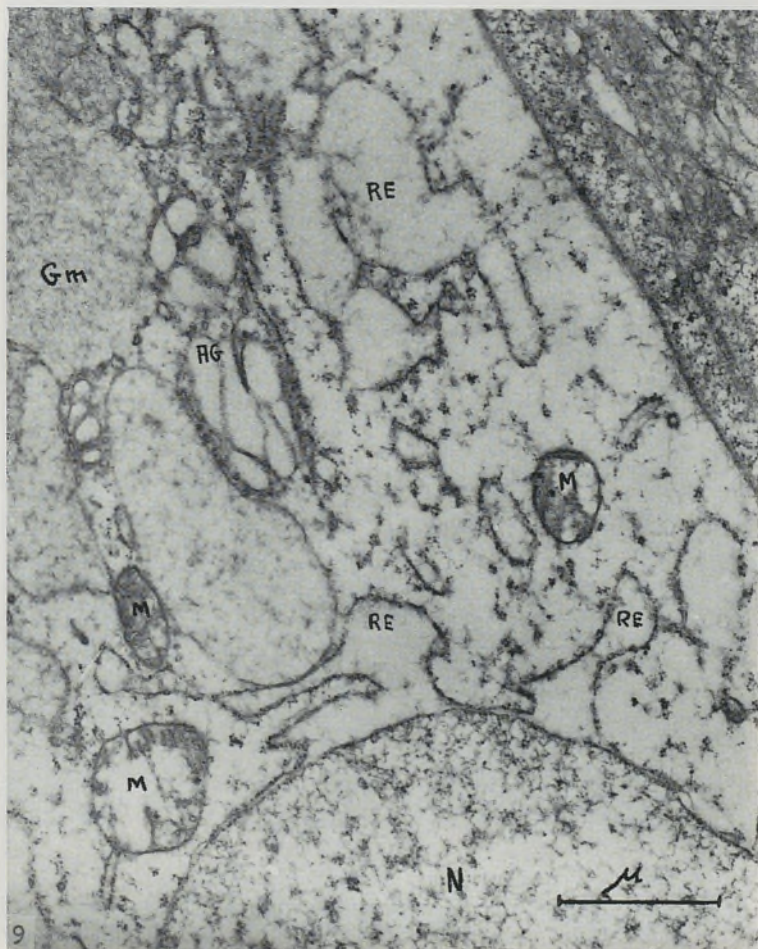


FIG. 9 — Célula caliciforme clara. Notar a continuidade da membrana nuclear externa com o retículo endoplásmico. N.Núcleo; M-Mitocôndrias; AG-Aparelho de Golgi; GM-Granulação mucosa; RE-Sacos ergastoplásmicos.

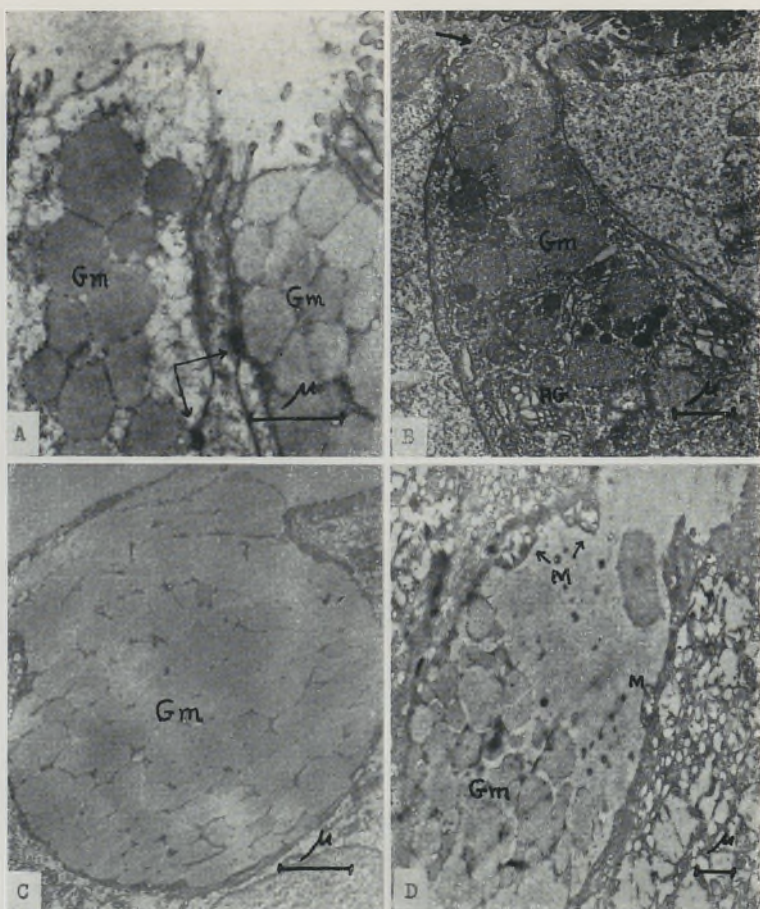


FIG. 10 — Imagens do ciclo secretório das células caliciformes.

- A — Duas células caliciformes, uma com citoplasma apical e raras microvilosidades, que faz proeminência na cavidade da glândula; na outra a membrana apical começa a desorganizar-se; desmosomas (\uparrow).
- B — Célula caliciforme, cuja membrana apical inicia o seu rompimento, antes da sua eliminação com o citoplasma superficial; «coloração» com acetato de urânio, segundo WATSON (1958);
- C — Teca de célula caliciforme da vilosidade jejunal. Extrusão do muco. Ausência de microvilosidades.
- D — Célula caliciforme de aspecto cavitário em que se observam mitocôndrias a serem eliminadas.



FIG. 11 — Célula caliciforme exausta. N-Núcleo de aspecto picnótico; RE-Reticulo endoplásmico vazio; M-Mitocôndrias; AG-Aparelho de Golgi reduzido. Gm-Granulações mucosas; notar a intensa osmiofilia e a presença de pequenas microvilosidades. «Coloração» com acetato de urânio.

DISCUSSÃO

SUPERFÍCIE APICAL — As microvilosidades foram descritas nas células mucosas da traqueia (RHODIN e DALHAMN, 1956) e do duodeno (TAYLOR, 1959) de rato.

HOLLMANN e HAGUENAU (1961) escreveram, a propósito da célula caliciforme do epitélio rectal do mesmo animal: «...la membrane de surface distendue possède quelques restes de microvilli, elle finira par se rompre sous la pression».

Estes autores não estabeleceram, portanto, as diferenças que notámos na superfície apical das células das criptas e das vilosidades.

Nas criptas, as células caliciformes têm inicialmente microvilosidades, menos numerosas que as das células principais adjacentes. Perdem-nas logo que se inicia a extrusão do produto elaborado.

Nas vilosidades, as células caliciformes apresentam por vezes uma fina membrana apical em desorganização, mas sem microvilosidades. O mais frequente é observar-se o muco em contacto com o lume intestinal, quer à superfície do epitélio, quer no fundo duma cavidade formada na célula caliciforme à custa da eliminação de grande parte da teca.

Surgem, porém, imagens raras de células situadas nas vilosidades que apresentam microvilosidades bem desenvolvidas e algumas granulações semelhantes às mucosas. As características gerais destas células não cabem na descrição que fizemos da célula caliciforme diferenciada. Tais imagens, aproximamo-las da observação de PALAY (1958, fig. 156), que o autor americano designou por «resting goblet cell». FLOREY (1960), refere-se-lhe deste modo: «It may well have been a goblet cell ready to be shed from a villus». A propósito desta última interpretação, queremos assinalar que as células que vão ser eliminadas da coluna epitelial apresentem um aspecto

ultra-estrutural bem diferente, que faz evocar as «Schmale Zellen» dos histologistas alemães (Fig. 11).

MITOCÔNDRIAS — Nos animais submetidos a um período de jejum as mitocôndrias são mais escassas e podem sofrer alterações estruturais. O facto foi referido por FAWCETT (1955) nas mitocôndrias do fígado, por BENSLEY (1953) nas células do pâncreas de ratos em jejum e por WEISS (1953) que confirmou estes dados em animais com uma dieta aquosa-açucarada durante 5-6 dias. A realimentação é seguida do reaparecimento do número habitual destes organitos (BENSLEY, 1953; DEMPSEY, 1956, 1958).

No entanto, a escassez de mitocôndrias na célula caliciforme verifica-se tanto nos animais em jejum e como nos animais alimentados é uma característica morfológica da célula.

A localização das mitocôndrias na porção basilar das células, por vezes em relação estreita com a membrana plasmática, tem sido referida em numerosos tipos celulares e tem uma explicação nas palavras de FAWCETT (1958): «It is not unreasonable to believe that certain membranes associated enzymes involved in transport mechanisms of the cells are thus brought into close proximity with a source of energy in the oxidative enzyme systems of the mitochondria».

A relação estreita das mitocôndrias com a membrana nuclear, observada também na célula caliciforme, seria própria de certos períodos de actividade da célula (FREDERIC, 1951; ORNSTEIN, 1956). A membrana nuclear apresentaria modificações por este facto (TOBIOKA e BIESELE, 1956). Com efeito, observámos, em alguns casos, um espessamento da membrana nuclear interna ao nível do contacto da mitocôndria com a membrana nuclear externa. «De telles images sugèrent fortement l'existence d'échanges entre les mitochondries, le noyau et le nucléole (CARASSO e FAVARD, 1961).

Em algumas observações, notámos que as mitocôndrias eram expulsas com o conteúdo mucoso da célula.

Este facto pode explicar a sua maior escassez nas células adultas, mas não põe fora de discussão possíveis alterações sofridas por este organito durante o ciclo secretório ...

APARELHO DE GOLGI, ERGASTOPLASMA E GRANULAÇÕES MUCOSAS. — A localização do aparelho de Golgi perto do polo superior do núcleo, quer constituindo uma massa simples, quer em agregados múltiplos, é habitual nas células glandulares (PALAY, 1958).

E a sua hiperplasia é uma característica constante da célula caliciforme, o que havia sido notado anteriormente por PALAY (1958) e HOLLMANN e HAGUENAU (1961).

As observações ultra-estruturais de numerosos tipos de células demonstraram uma actividade dinâmica do aparelho de Golgi na formação dos grânulos de secreção (Cf. HAGUENAU e BERNHARD, 1955; DAVID FERREIRA, 1959; GABE e ARVY, 1961; CARASSO e FAVARD, 1961).

As nossas observações ao nível da célula caliciforme estão de acordo com aqueles dados e com o observado inicialmente por RHODIN e DALHAMN (1956), PALAY (1958), FLOREY (1960) e HOLLMANN e HAGUENAU (1961).

A riqueza da zona de Golgi, a sua hiperplasia, a presença de granulações de secreção acima dos elementos golgianos; as imagens de transição observadas entre as microvesículas, os vacúolos de Golgi e as granulações mucosas; e a ausência de granulações no interior dos sacos ergastoplásmicos, — são dados a favor de uma participação activa do aparelho de Golgi na formação das granulações de muco (FIGS. 6 e 7).

SHEARMAN e MUIR (1960) descreveram nos sacos ergastoplásmicos da célula caliciforme do intestino grosso uma substância homogénea que apresentava a mesma densidade do muco e que, em alguns casos, estaria em continuidade com a substância que constitui o grânulo mucoso. As suas imagens não nos parecem, porém, as melhores para tirar tais conclusões.

Nas nossas observações os grânulos mucosos apresentam sempre uma osmiofilia muito mais acentuada que a do conteúdo do retículo endoplásmico e têm uma fina estrutura granular. Por outro lado, nunca observámos tal continuidade entre os sistemas de duplas membranas paralelas do retículo endoplásmico e da membrana que rodeia a granulação de muco, membrana que se apresenta lisa.

*

* *

A microscopia electrónica permite cada vez mais a integração dos dados morfológicos, bioquímicos e funcionais.

Assim, sabe-se que a basofilia está relacionada com a riqueza de ribonucleoproteínas e que estas se encontram localizadas especialmente à superfície das partículas densas (OGURA e SASAGAWA, 1956) que estão aderentes às membranas do retículo endoplásmico ou dispersas na matriz celular (ribosomas ou grão de PALADE, 1955, 1958). As células ricas de ribosomas são as que incorporam maior quantidade de amimo-ácidos marcados (SIEKEVITZ, 1959).

A síntese proteica teria lugar ao nível destas partículas de RNP, iniciada por uma activação enzimática complexa. O produto sintetizado encaminhar-se-ia pelo retículo endoplásmico para o aparelho de Golgi, hipótese que tem a apoiá-la certos dados morfológicos de continuidade entre os dois organitos, referida por alguns investigadores (PALADE, 1955; FARQUHAR e RINEHART, 1954; CARASSO e FAVARD, 1961).

A diminuição do ergastoplasma nas células com uma teca bem desenvolvida está de acordo com a utilização de materiais ergastoplásmicos na síntese do produto de secreção.

O estudo da célula caliciforme mostra que os fenómenos de secreção que nela têm lugar são comparáveis aos de numerosas outras células elaboradoras. Este facto

reabilita esta célula, até certo ponto, como exemplo de célula exócrina (mucosa), em relação, por exemplo, à célula serosa do pâncreas, onde os mecanismos de secreção têm sido estudados com entusiasmo esquecendo-se, porventura, o excelente material de estudo que é a célula caliciforme do intestino.

*

* *

Agradecimentos: O estudo da ultra-estrutura do epitélio intestinal foi-me proposto pelo Ex.^{mo} Senhor Professor Xavier Morato, a quem quero agradecer todas as facilidades que me tem concedido para o estudo das técnicas da Microscopia Electrónica e os conselhos amigos com que tem orientado o meu trabalho.

Agradeço também, neste momento, aos Ex.^{mos} Senhores Professores Tavares de Sousa e Renato Trincão o terem indicado o meu nome para o Curso de Microscopia Electrónica de 1961-1962, realizado no Laboratório de Microscopia Electrónica Calouste Gulbenkian do Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina de Lisboa.

À Fundação Calouste Gulbenkian agradeço a possibilidade material de poder estudar este sector da investigação morfológica.

RESUMO

Neste trabalho o A. estuda ao microscópio electrónico a célula caliciforme do epitélio jejunal do rato (2-3 meses de idade). O material foi fixado no soluto a 1% de tetróxido de ósmio tamponado com acetato veronal (pH 7,2), incluído em metacrilato de n-butilo e observado ao microscópio RCA EMU 3.

As observações do A. estão de acordo com as de PALAY (1958) e HOLLMANN e HAGUENAU (1961). Sublinha, no entanto, os seguintes factos:

1) A observação constante, nas criptas e nas vilosidades do jejuno, de células de citoplasma claro (células caliciformes claras) e células de citoplasma denso (células caliciformes escuras) leva-o a admitir a existência de um ciclo secretório, do qual os dois tipos celulares citados representam estados funcionais diferentes.

2) Nos animais estudados, as células das criptas de LIEBERKUHN, antes do início da excreção, apresentam sempre microvilosidades menos numerosas e menos desenvolvidas que nos enterocitos; com a elaboração das granulações e a sua acumulação no citoplasma apical, a superfície livre da membrana celular distende-se e rompe-se ou é eliminada com porções citoplásmicas superficiais, ficando as granulações mucosas em contacto com o lume da glândula.

3) As células caliciformes das vilosidades, ao contrário das células das criptas, não apresentam microvilosidades e as suas granulações estão em contacto com o lume intestinal ou separadas dele por uma delgada membrana apical distendida ou em desagregação.

4) O A. observou, porém, nas vilosidades, algumas células pouco osmiófilas, com microvilosidades e contendo granulações semelhantes às mucosas. Aproxima tais imagens das observadas por PALAY (1958) e que o autor americano designou por «resting goblet cells» e que FLOREY (1960) supõe ser «goblet cells ready to be shed from a villus».

O A. estuda também os organitos da célula caliciforme e refere a densidade variável aos electrões das granulações de muco, cuja formação discute: as imagens de transição entre os elementos golgianos e as granulações mucosas sugerem a participação directa deste organito na sua elaboração, o que não o impede de admitir também a intervenção do material ergastoplásmico na síntese do produto de secreção.

O A. nunca observou, porém, granulações de muco no interior dos sacos ergastoplásmicos.

RÉSUMÉ

L'A. rapporte le résultat de ses observations sur la cellule caliciforme de l'épithélium jéjunal du Rat (agé de 2-3 mois) étudiée au microscope électronique. Le matériel a été fixé en tetroxyde d'osmium à 1 % tamponné (pH 7,2), inclus en metachrylate de n-butyle et observé au microscope RCA EMU 3.

Les observations de l'A. sont en accord avec celles de PALAY (1958) et HOLLMANN et HAGUENAU (1961), mais quelques détails sont mis en relief:

1) L'observation constante de cellules à cytoplasme claire (cellules caliciformes claires) et de cellules à cytoplasme dense (cellules caliciformes foncées) le mène à admettre l'existence d'un cycle sécrétoire, les deux types cellulaires cités ci-dessus en représentant stades fonctionnels différents.

2) Chez les animaux étudiés, les cellules caliciformes des cryptes de Lieberkühn, avant le début de l'excrétion présentent toujours des microvilli moins nombreuses et moins développées que l'enterocyte; avec l'élaboration des granulations et leur accumulation dans le cytoplasme apical, la surface libre de la membrane cellulaire se tend et se rompt ou s'élimine avec des portions cytoplasmiques superficielles, les granulations muqueuses restant en contact avec la lumière de la glande de Lieberkühn.

3) Les cellules caliciformes des villosités, au contraire de celles des cryptes, ne présentent jamais de microvilli, et leurs granulations muqueuses sont en contact avec la lumière intestinale ou en sont séparées par une mince membrane apicale distendue ou en désagrégation.

4) Dans les villosités, l'A. a aussi observé quelques cellules faiblement osmiophiles pourvues de microvilli et contenant des granulations semblables à celles des cellules muqueuses. Il s'agit très probablement des cellules que PALAY (1958) a désigné sous le nom de «resting

goblet cells», les mêmes que FLOREY (1960) admet être des «goblet cells ready to be shed from a villus».

L'A. fait la description des organites cellulaires des cellules caliciformes et il attire l'attention sur le fait qu'il existe des granulations muqueuses de densité variable. Finalement, il discute la formation des grains de sécrétion. Les images de transition entre les éléments de l'appareil de GOLGI et les granulations suggèrent la participation directe de cet organite dans l'élaboration des granulations muqueuses, ce qui ne l'empêche pas d'admettre aussi l'intervention des matériaux ergastoplasmiques dans la synthèse du produit de sécrétion. Toutefois, l'A. n'a jamais vu des granulations à mucus à l'intérieur des sacs ergastoplasmiques.

SUMMARY

The A. relates his electron microscopic observations on the goblet cells of the Rat's jejunal epithelium (aged 2-3 months). The material was fixed in a 1% osmium tetroxide solution buffered with veronal acetate (pH 7,2), embedded in n-butyl methacrylate and examined in a RCA EMU 3 microscope.

The A.'s observations agree with those of PALAY (1958) HOLLMANN and HAGUENAU (1961), but he emphasizes the following facts:

1) The constant finding of light goblet cells and dark goblet cells at jejunal crypts and villus lead him to admit a secretory cycle, the two appointed cellular types representing two different functional states.

2) In the animals under observation, the cells of the LIEBERKÜHN crypts, always show less numerous and less developed microvillus than those of columnar cells, before excretion; during the elaboration of the secretory product and its accumulation at the apical cytoplasm the free surface of the cellular membrane is distended

and burpts out or is expelled with superficial cytoplasmic fragments, the mucous granulations being then put in connection with the gland lumen.

3) Unlike the crypt cells, the villus goblet cells have no microvillus and their granulations are in contact with intestinal lumen or separated from it by a thin apical membrane, which can be distended or desorganized.

4) At the villus, however, the A. observed some scarcely osmiophilic cells with microvillus and granulations like those mucous ones. He compares these images to those observed by PALAY (1958) who named them «resting goblet cells» and to wath is considered by FLOREY (1960) to be «goblet cells ready to be shed from a villus».

The A. also studies the organites of the goblet cells and refers to the different electronic density of the mucous granulations. On the development of the latter, the following is argued: the transitional images between the GOLGI elements and the mucous granulations lead the A. to believe in the direct participation of this organite in its elaboration but, on the other hand, this doesn't prevent him from admitting the intervention of ergastoplasmic material in the synthesis of the secretion product.

The A. never observed mucous granulations inside the ergastoplasmic sacs.

BIBLIOGRAFIA

- BENSLEY, R.R. — Symposium: The structure and biochemistry of mitochondria. Introduction. *J. Histochem. Cytochem.*, 1, 179-182, 1953.
- CARASSO, N. e P. FAVARD — Les Ultrastructures Cytoplasmiques. In *Traité de Microscopie Électronique*, Ed. C. MAGNAN, Herman-Paris, 1961, p. 901-1117.
- DAVID FERREIRA, J.F. — A diferenciação do condrioma, aparelho de Golgi e ergastoplasma. These, 214 p., Lisboa, 1959.
- DAWSON, A.B. — Argentaffin cells of the gastric mucous of the rabbit, guinea-pig, mouse and hamster. *Anat. Rec.*, 91, 53-64, 1945.
- DEMPSEY, E.W. — Variations in the structure of the mitochondria. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 suppl., 305-312, 1956.
- Current concepts of cellular structures. In «*Frontiers in Cytology*» Ed. S.L. FARQUHAR PALAY — Yale Univ. Press, New Haven p. 9-18, 1958.
- M. G. e J. F. RINEHART — Cytologic alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy: an electron microscope study. *Endocrinology*, 55, 857-876, 1954.
- FAWCETT, D.W. — Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 15, 1457, 1955.
- Structural specialization of the cell surface. In «*Frontiers in Cytology*», Ed. S.L. PALAY, Yale univ. Press. New-Haven, p. 19-41, 1958.
- FLOREY, H.W. — Electron microscopic observations on goblet cells of the rat's colon. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 45, 329-336, 1960.
- FREDERIC, J. — Rapports de la membrana nucléaire avec les nucléoles et les chondriomes. Étude sur le vivant et en contraste de phase. *C.R. Soc. Biol.*, 145, 1913-1916, 1951.
- GABE, M. e L. ARVY — Gland cells. *The Cell*, 5, 2, 1-88, 1961.
- HAGUENAU, F. e W. BERNHARD — L'appareil de Golgi dans les cellules normales et cancéreuses de vertébrés. Rappel historique et étude au microscope électronique. *Arch. d'Anat. Micr. et Morphol. Exp.*, 44, 27-55, 1955.
- HOLLMANN, K.H. e F. HAGUENAU — Sur l'ultrastructure de la cellule à mucus de l'épithélium rectal du Rat. *C.R.Soc. Biol.*, 155, 1780-1789, 1961.
- e W. STAUBLI — L'ultrastructure des polypes du rectum chez l'Homme. *J. Microscopie*, 1, 137-142, 1962.

- MEYER, K. — Mucoids and Glycoproteins. *Advances in Protein. Chem.*, 2, 249-275, 1945.
- MOE, H. — On goblet cells, especially of the intestine of some mammalian species. *Int. Rev. Cytol.*, 4, 299-334, 1955.
- OWURA, M. e K. SASAGAWA — Electronmicroscopic studies on the fine structure and biophysical properties of intracytoplasmic granules. *Proc. First Regional Conf. on E.M. in Asia and Oceania, Tokyo*, p. 257-264, 1956.
- ORNSTEIN, L. — Mitochondrial and nuclear interaction. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 suppl., 351-352, 1956.
- PALADE, G.E. — A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 95, 285-298, 1952.
- — A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1, 59-68, 1955.
- — A small particulate component of the cytoplasm. In «*Frontiers in Cytology*», Ed. S. L. PALAY, Yale Univ. Press, New-Haven, p. 283-304, 1958.
- PALAY, S.L. — The morphology of secretion. In «*Frontiers in Cytology*», p. 305-342, 1958.
- e L. J. KARLIN — An electron microscopy study of the intestinal villus. I. The fasting animal. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, 363-372, 1959.
- POLICARD, A. e C.A. BAUD — Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus. Masson — Paris, p. 343, 1958.
- PORTER, K. e J. BLUM — A study of microtomy for electron microscopy. *Anat. Rec.*, 117, 685-712, 1953.
- RHODIN, J. e T. DALHAMN — Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in Rat. *Z. Zellforsch.*, 44, 345-412, 1956.
- SCHOFIELD, G. — The argentaffin cells of the small intestine of the guinea-pig. *Acta Anat.*, 11, 414-430, 1950-51.
- — The argentaffin and mucous cells of the small and large intestine of the mouse. *Acta Anat.*, 16, 1-15, 1952.
- — The argentaffin and mucous cells of the human intestine. *Acta Anat.*, 18, 256-272, 1953.
- SHEARMAN, D.J.C. e A.R. MUIR — Observations on the secretory cycle of the goblet cells. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 45, 337-342, 1960.
- SIEKEVITZ, P. — The cytological basis of protein syntesis. *Exp. Cell. Research.*, suppl. 7, 90-110, 1959.
- STACEY, M. — The chemistry of mucopolysaccharides and mucoproteins. *Advances in Carbohydrate Chem.*, 2, 162-201, 1946.

- STEEDMAN — Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. *Quart. J. Micr. Sc.*, 91, 477-479, 1950.
- TAYLOR, J. — Observations on the ultrastructure of the goblet cell of the Rat duodenum. (Abstract). *Anat. Rec.*, 133, 434, 1959.
- TOBIOKA, M. e J. BIESELE — Mitochondria in living cells: an analysis of movements. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 suppl., 319-324, 1956.
- WATSON, M.L. — The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1, 257-270, 1955.
- WATSON, M.L. — Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 475-478, 1958.
- WEISS, J.M. — The ergastoplasm: its fine structure and relation to protein synthesis as studied with the electron microscope in the pancreas of the swiss albino mouse. *J. Exp. Med.*, 98, 607-618, 1953.
- WERNER, I. — Studies on glycoproteines from mucous epithelium and epithelial secretion. *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, 58, 1, 1953.

Trabalho realizado no Laboratório de Microscopia Electrónica Calouste Gulbenkian do Instituto de Histologia e Embriologia. (Director: Prof. M.J. Xavier Morato). Faculdade de Medicina de Lisboa.

FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Vol. XXXVI

N.º 8

ORIGEM DAS ARTÉRIAS SEPTAIS DO CORAÇÃO DO CANIS FAMILIARIS

POR

HERMÊNIO CARDOSO

Prof. Extr. da Faculdade de Medicina de Coimbra

e

ARMANDO AUGUSTO PENAS LEAL GONSALVES

Licenciando

SUMÁRIO:

1 — Material e técnica. 2 — Distribuição das artérias coronárias cardíacas no canis familiaris. 3 — Irrigação do septo interventricular. 4 — Conclusões. 5 — Résumé, summary, Zusammenfassung. 6 — Bibliografia.

O canis familiaris tem sido utilizado frequentemente para os estudos experimentais respeitantes ao coração.

Estávamos realizando experiências de obliteração rápida ou lenta dos ramos das artérias coronárias cardíacas do cão e fomos surpreendidos com alguns resultados que para podermos interpretar nos induziram a observar a distribuição das artérias coronárias cardíacas do cão.

MATERIAL E TÉCNICA

A distribuição das artérias coronárias cardíacas do cão foi estudada em vinte corações de cães adultos.

Escolhemos o método radiográfico em corações isolados, dos quais obtivemos 54 imagens radiográficas.

Como substância de contraste utilizámos uma mistura de minio e colódio, que foi injectada nas duas artérias coronárias cardíacas, ou somente em uma delas, ou em qualquer dos seus ramos que pretendíamos observar.

As radiografias são em parte de corações íntegros, em diversas incidências, outras são de corações planificados e isoladamente do septo interventricular.

Na presente publicação apresentamos algumas radiografias que nos mostram a distribuição das artérias septais interventriculares e a sua origem.

DISTRIBUIÇÃO DAS ARTÉRIAS CORONÁRIAS
CARDÍACAS NO CANIS FAMILIARIS

A artéria coronária esquerda do cão tem origem na aorta, aproximadamente ao nível do bordo livre da válvula sigmóide esquerda, dirige-se para baixo e para a esquerda, dividindo-se após um percurso em média de 0,4 cm, nos seus dois ramos terminais: interventricular anterior e circunflexa. (Fig. 1, 2, 4, 6 e 8).

A artéria interventricular anterior (Fig. 4 e 8) pode seguir o sulco, que lhe dá o nome, ou deslocar-se ligeiramente para a direita, ou para a esquerda. Em todos os casos estudados atingia a ponta do coração, contornava-a, seguindo no sulco interventricular posterior um percurso variável (artéria interventricular posterior recorrente. Fig. 2 e 4).

No seu trajecto dá ramos colaterais para a direita, para a esquerda e perfurantes septais.

Os ramos para a direita são de cinco a sete, dirigem-se para o ventrículo direito, irrigando uma faixa de um centímetro de largura, na sua parede anterior e parte da região inferior deste ventrículo.

Os ramos esquerdos em número idêntico ao do lado oposto são, no entanto, de maior calibre. Irrigam, com os ramos descendentes da circunflexa, a parede anterior do ventrículo esquerdo e a ponta do coração (Fig. 1).

As perfurantes septais são anteriores e pósteroinferiores.

Os ramos perfurantes anteriores (Figs. 3, 5 e 12), têm a sua origem na interventricular anterior, são em número de treze a dezoito, irrigam todo o septo no seu quarto inferior e irrigam os dois terços anteriores do septo nos seus três quartos superiores.

A primeira perfurante distingue-se de todas as outras, porque tem um calibre muito maior, percorre grande parte do septo interventricular de diante para trás e dá numerosos ramos colaterais.

Os ramos perfurantes pósteroinferiores (Figs. 3, 5 e 8) são em número de três ou quatro e distribuem-se no quarto inferior do septo interventricular.

A artéria circunflexa ou aurículo-ventricular esquerda (Figs. 1, 2, 6 e 7) segue pelo sulco aurículo-ventricular esquerdo.

Em todos os corações estudados verificámos que a circunflexa contorna o bordo esquerdo do coração, continuando o seu percurso no sulco aurículo-ventricular da face posterior do coração até atingir o sulco interventricular posterior pelo qual seguia, percorrendo-o nos seus três quartos ($3/4$) ou quatro quintos ($4/5$) superiores (artéria interventricular posterior Figs. 2, 7 e 9).

Notámos os seguintes ramos colaterais:

1.º — Ramos descendentes. São em grande número e distribuem-se pela face anterior do ventrículo esquerdo; pelo bordo esquerdo do ventrículo esquerdo (artéria marginal esquerda); pela face posterior do ventrículo

esquerdo e pela face posterior do ventrículo direito junto do sulco interventricular posterior.

2.º — Ramos ascendentes. São numerosos, irrigando quase toda a aurícula esquerda. Em todos os corações estudados observámos um ramo que nascia, aproximadamente, a um centímetro da origem da circumflexa, dirigia-se para a aurícula direita, encurvando-se, em seguida, para a aurícula esquerda.

3.º — Ramos perfurantes septais posteriores. São 12 a 15 ramos septais que nascem da interventricular posterior, isto é, da porção terminal da circumflexa. São ramos que irrigam a parte posterior e superior do septo interventricular.

A artéria coronária cardíaca direita do cão (Fig. 10) nasce ao nível do bordo livre da sigmóide direita e tem menor calibre do que a esquerda.

Da sua origem dirige-se para a direita e ligeiramente para baixo, atingindo depois de curto percurso, o sulco aurículo-ventricular direito onde caminha na espessura do tecido célula-adiposo; contorna o bordo direito do coração.

Termina antes de atingir o sulco interventricular posterior, tomando uma direcção descendente, tornando-se paralela ao sulco interventricular posterior.

No seu trajecto dá os seguintes ramos colaterais:

1.º — Ramos descendentes. São em número de dez (10) a quinze (15) e distribuem-se na parede anterior, no bordo direito e na parede posterior do ventrículo direito. Um dos ramos mais grossos é a artéria do bordo direito (marginal direita), que percorre este bordo sem, no entanto, atingir a ponta do coração. Os outros ramos irrigam a maior parte das paredes anterior e posterior do ventrículo direito, sem atingirem as zonas mais próximas dos sulcos interventriculares, anterior e posterior (Figs. — 10 e 11).

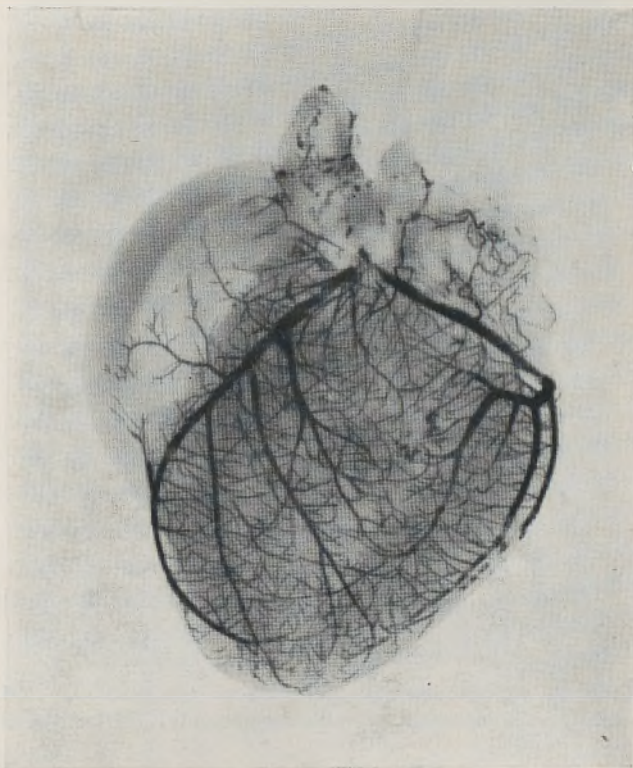


FIG. 1. — Repleção e radiografia da coronária cardíaca esquerda do *Canis familiaris* (Obs. 18). Radiografia ântero-posterior.

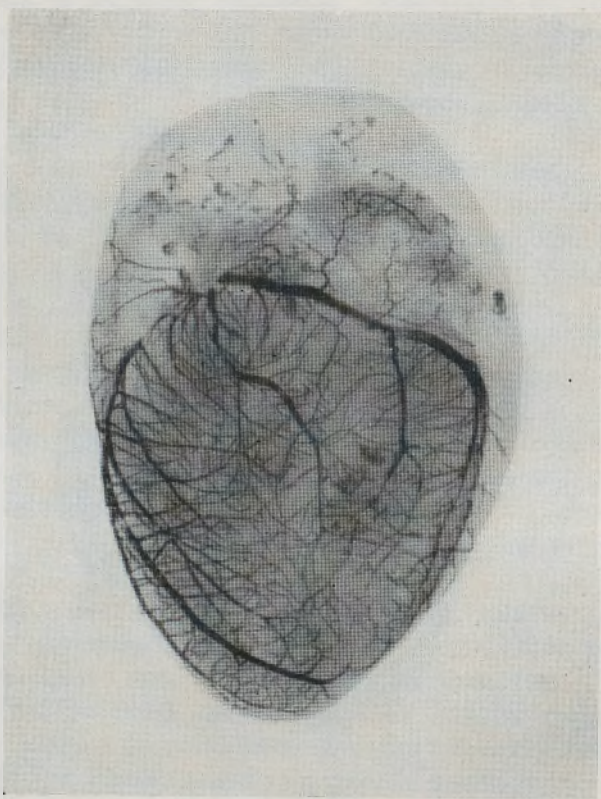


FIG. 2. — Repleção e radiografia de perfil da coronária cardíaca esquerda do *Canis familiaris* (Obs. 18).

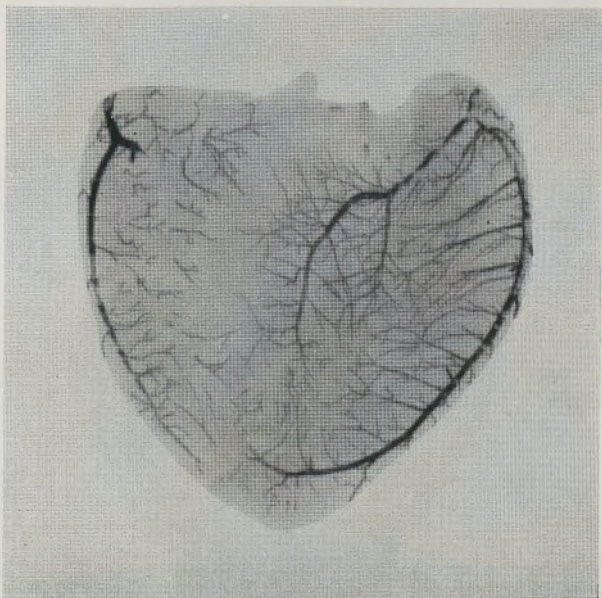


FIG. 3. — Repleção da coronária cardíaca esquerda do *Canis familiaris* (Obs. 18) e radiografia do septo interventricular isolado.

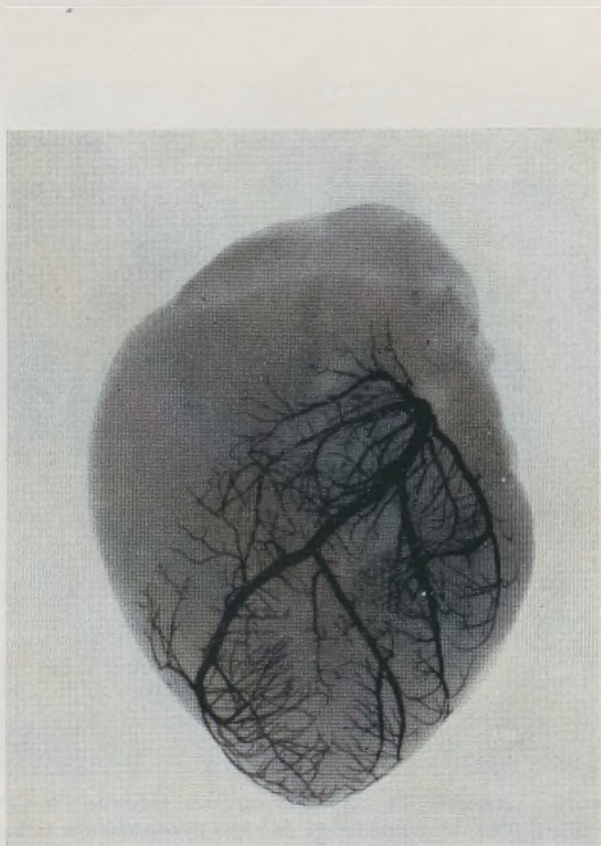


FIG. 4. — Repleção da artéria interventricular anterior do *Canis familiaris* e radiografia ântero-posterior (Obs. 23).



FIG. 5 — Repleção da artéria interventricular anterior do *Canis familiaris* e radiografia do septo interventricular isolado (Obs. 23).

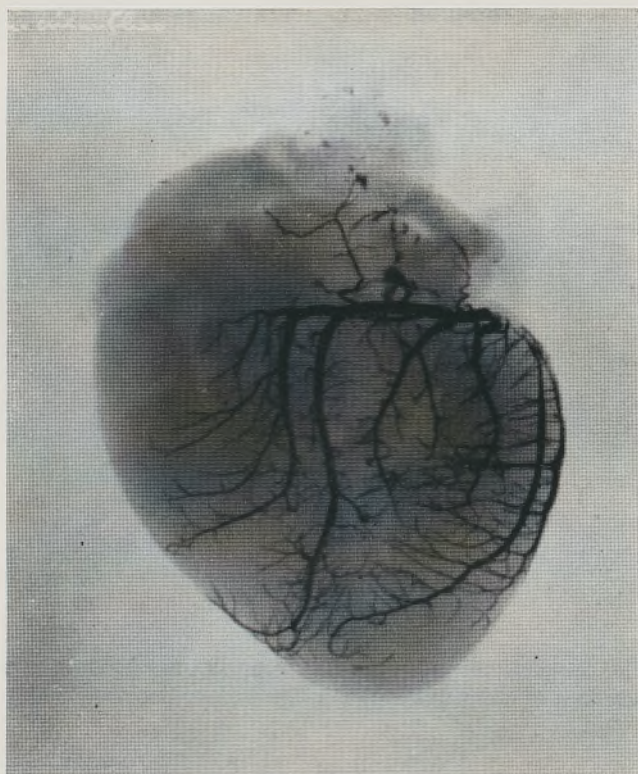


FIG. 6. — Repleção da artéria circunflexa do *Canis familiaris* e radiografia de perfil (Obs. 22).



FIG. 7— Repleção da artéria circunflexa do *Canis familiaris* e radiografia do septo interventricular isolado (Obs. 22).

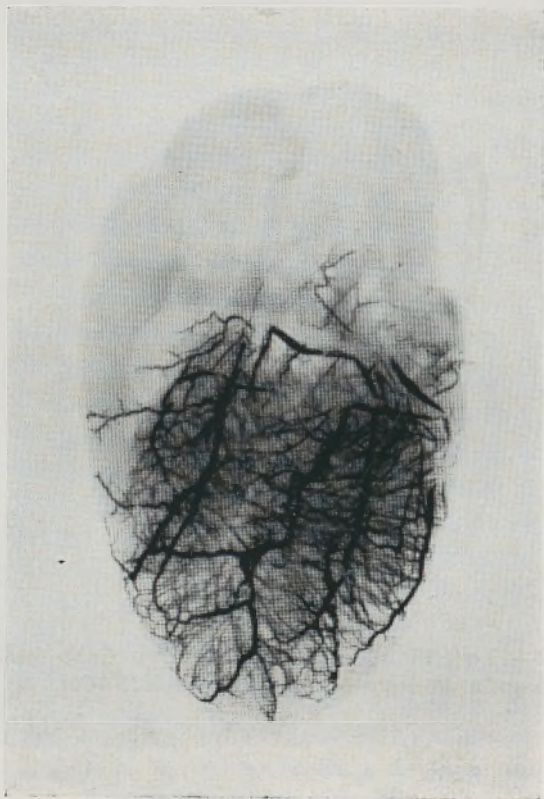


FIG. 8.—Repleção e radiografia ântero-posterior da coronária cardíaca esquerda do *canis familiaris* (Obs. 27).



FIG. 9. — Repleção da coronária cardíaca esquerda do *Canis familiaris* e radiografia do septo interventricular isolado (Obs. 27).



FIG. 10. — Repleção da coronária cardíaca direita do *Canis familiaris* e radiografia ântero-posterior (Obs. 24).



FIG. 11. — Repleção da coronária cardíaca direita do *Canis familiaris* e radiografia do septo interventricular isolado (Obs. 24).



FIG. 12. — Repleção da artéria interventricular anterior do *Canis familiaris* e radiografia do septo interventricular isolado (Obs. 10).

IRRIGAÇÃO DO SEPTO INTERVENTRICULAR

As artérias septais anteriores (Figs. 2, 3, 5 e 12) têm a sua origem na artéria interventricular anterior, que é um ramo terminal da coronária esquerda; são em número de treze a dezoito, irrigando a parte inferior do septo (1/4 inferior) e os dois terços anteriores da parte restante. A primeira septal anterior é sempre de calibre maior do que as outras, percorre uma grande parte do septo interventricular, dando numerosas colaterais.

As artérias septais posteriores (Figs. 3, 5, 7, 9, 11 e 12), são em número de quinze a vinte e provêm da porção terminal da artéria interventricular anterior para a quarta parte inferior do septo, tendo as restantes a sua origem na artéria interventricular posterior, que representa a porção terminal da artéria circunflexa.

*Trabalho realizado no Laboratório de
Anatomia Normal da Faculdade de Medi-
cina de Coimbra.*

Director: Prof. MAXIMINO CORREIA.

CONCLUSÃO

Os A.A. estudaram a distribuição das artérias coronárias cardíacas de vinte corações de cães adultos.

Empregaram o método radiográfico em corações isolados, planejados e isolando o septo interventricular.

As artérias septais anteriores (13 a 18) têm a sua origem na artéria interventricular anterior que é ramo da coronária esquerda.

As artérias septais posteriores (15 a 20) têm a sua origem na porção terminal da artéria interventricular anterior ou da artéria interventricular posterior que é a parte terminal da artéria circunflexa que também é ramo da coronária esquerda.

Em todas as observações feitas pelos A.A. verificaram que o septo interventricular é irrigado somente pela artéria coronária esquerda.

RÉSUMÉ

Les A.A. ont étudié la distribution des artères coronaires cardiaques de vingt coeurs de chiens adultes.

Ils ont employé la méthode radiographique sur des coeurs isolés, étendus et en isolant le cloison interventriculaire.

Les artères septales antérieures (13 a 18) ont leur origine dans l'artère interventriculaire antérieure qui est une branche de la coronaire gauche.

Les artères septales postérieures (15 a 20) prennent naissance dans la portion terminale de l'artère interventriculaire postérieure, qui est la partie terminale de l'artère circonflexe qui, elle aussi, est une branche de la coronaire gauche.

Dans toutes les observations faites par les A.A., il a été vérifié que le cloison interventriculaire est irrigué, uniquement, par l'artère coronaire gauche.

SUMMARY

The Authors studied the distribution of the arteriae coronariae cordis of twenty hearts of adult dogs. They employed the radiographic method in isolated hearts, planed and isolating the septum interventriculare. The anterior septal arteries (13 to 18) have their origin in the arteria interventricularis anterior, which is a branch of the left coronary artery. The posterior septal arteries (15 to 20) have their origin in the terminal part of the arteria interventricularis anterior or of the arteria interventricularis posterior, which is the terminal part of the ramus circumflexus, that is also a branch of the left coronary artery.

In all the Authors' observations, they noted that the septum interventriculare is irrigated by the left coronary artery, only.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser studierten die Verteilung arteriarum coronariarum cordis von zwanzig Herzen von erwachsenen Hunden. Sie wandten die radiographische Methode in geglätteten, isolierten Herzen an, und isolierten Septum interventriculare. Arteriae septaliae anteriores (13 bis 18) haben ihren Ursprung in arteria interventriculare anteriore, die ein Zweig von linker coronaria, ist. Arteriae septaliae posteriores (15 bis 20) haben ihren Ursprung im Ende arteriae interventricularis anterioris oder arteriae interventricularis posterioris, die ein Schlussteil rami circumflexi, welche auch ein Zweig linker coronariae, ist.

In allen Untersuchungen, die von den Verfassern gemacht wurden, stellten sie fest dass, septum interventriculare nur in linker arteria coronaria durchlaufen, ist.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AMPLATZ (KURT). — Technics of coronary arteriography. *Circulation*. Vol. XXVII, n.º 1, p. 101. January, 1963.
- 2) BAROLDI (G.) e SCOMAZONI (G.). — Circulação coronária e lesão miocárdica. *Revista Terapêutica*, p. 64, 1959/4.
- 3) BARTHE (RENÉ). — Problème Médico-Social des Cardiaques. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (A. Laffont e F. Durieux). Vol. Coeur 11 041, p. 1, 1960.
- 4) BROUSTET (P.). — Les progrès de la Thérapeutique Medicale en Cardiologie. *Maroc Medical*, Ano 41, n.º 440, p. 17. Janvier 1962.
- 5) CELESTINO DA COSTA (J.). — Possibilidades da Cirurgia Cardio-vascular sob Hipotermia Moderada. *Jornal do Médico*. Vol. XLVI n.º 971. Setembro 1961.
- 6) CHATTERJEE (KHAGENDRA N.), WARREN (RICHARD). — Closure of Coronary Arteriotomy in the dog by Means of an Autogenous Arterial Patch. *Circulation*. Vol. XXVII, n.º 4, Part. two, p. 708. April 1963.
- 7) CORREIA (MAXIMINO). — Contribution à l'Étude de la Vascolarisation du Cardionecteur, in C.R. de l'association des Anatomistes, 1934.
- 8) — — — A Irrigação arterial dos Músculos Papilares do Coração Humano, in *Archives Portugaises des Sciences Biologiques*, tómo V, 1963.
- 9) — — — Algumas Particularidades da Circulação Cardíaca, in *Coimbra Médica*, Vol. III, n.º 5, Maio de 1936.
- 10) — — — Nova Contribuição para o Estudo da Circulação Cardíaca. Circulação Venosa. (Comunicação à V Reunião da Sociedade Anatómica Portuguesa, realizada em Coimbra, em 1937).
- 11) — — — Contribuição para o estudo da circulação cardíaca. Circulação venosa. Trabalho apresentado nas reuniões Médicas da Faculdade de Medicina de Coimbra, em 1937.
- 12) — — — Circulação Vicariante do Miocárdio. (Vicarious circulation of the myocardium). Comunicação apresentada ao Congresso Médico Internacional de Moçambique de 1938, in *Livro do «Primeiro Congresso Médico de Lourenço Marques»*, Imprensa Nacional de Moçambique, 1938, Vol. I, pág. 315.

- 13) CORREIA (MAXIMINO). — Papel das Artérias Extra-Cardíacas na Irrigação do Miocárdio. (The role of the extra cardiac arteries in the myocardial circulation). Comunicação ao Congresso de Lourenço Marques, 1938.
- 14) ——— Les Anastomoses entre les Artères Coronaires du Coeur, in Presse Médical, n.º 87, de 24 de Novembro de 1939.
- 15) ——— Apresentação e crítica dos Métodos Angiográficos 1940. Lição do Curso de Férias da Fac. de Medicina.
- 16) ——— Modificação da Circulação Arterial em Certos Estados Patológicos, 1942.
- 17) ——— Algumas Modalidades de Anastomoses entre as Artérias Coronárias Cardíacas, 1942.
- 18) ——— Modificação da Circulação Cardíaca em Certos Estados Patológicos.
- 19) ——— A Circulação Coronária Cardíaca, in Aquisições recentes de angiocardiolgia, Coimbra 1941.
- 20) ——— Descrições de um Coração Anómalo. Folia Anat. Univ. Conimb. XXIV, 1, Coimbra, 1949.
- 21) ——— Contribution à l'Étude de la Circulation Artérielle du Coeur. Folia Anat. Univ. Conimbr., XXI, 7, 1946.
- 22) ——— A Irrigação Arterial dos Músculos Papilares do Coração Humano. Folia Anat. Univ. Conimbr., XXI, 11, 1946.
- 23) ——— Contribution à l'Étude de la Vascularisation du Cardionecteur. Folia Anat. Univ. Conimbr., XXI, 10, 1946.
- 24) ——— A Propósito de Dois Casos de Anastomoses entre as Duas Artérias Coronárias Cardíacas. Folia Anat. Univ. Conimbr., XXII, 4, 1947.
- 25) ——— Les Anastomoses entre les Artères Coronaires du Coeur. Folia Anat. Univ. Conimbr., XXII, 5, 1947.
- 26) ——— Notas Anatomofisiológicas sobre a Circulação Cardíaca. Folia Anat. Univ. Conimbr., XXXV, 1, 1960.
- 27) ——— e CARDOSO (HERMÉNIO). — Diversas Anomalias dum Coração. Folia Anat. Univ. Conimbr., XXIX (6): 24 págs., Coimbra, 1955.
- 28) EUSTERMAN (JOSEPH H.), ACHOR (RICHARD W. P.) KINCAID (OWINGS W.) and BROWN (ARNOLD L. Jr.). — Atherosclerotic disease of the coronary arteries. A pathologic-radiologic correlative study. Circulation. Vol. XXVI, n.º 6, p. 1 288, December 1962.
- 29) GUGLIELMO (LÚCIO di). — Angiografia Coronaria. Rassegna médica. Vol. XL, n.º 1, p. 13, 1963.
- 30) HILEEMAND (B.). — Valeur diagnostique du dosage des transaminase sériques dans les infarctus myocardiques a manifestations électocardiographiques

- muettes ou tardives. La semaines des hospitaux. N.º 24, p. 1 479, Avril 1962.
- 31) JOUVE (A.), HENRY (E.), COURBIER (R.). — Anatomie du Coeur. Vol. Coeur. Encyclopédie Médico-Chirurgicale (A. Laffont e F. DURIEUX) 11 001 A¹⁰, p. 1, 1960.
- 32 — KEYS (A.), FIDANZA (F.). — A Problem of Current Interest: Ischemic cardiopathy in Relation to the type of Life. Rassegna Médica XXXIII, n.º 3, p. 127, 1956.
- 33) KEYS (ANCEL) e MINNEAPOLIS (PH. D.). — Diet and Epideomiology of Coronary Heart Disease. J.A.M.A. Vol. 164, n.º 17, p. 1 912, August 1957.
- 34) KOLFF (WILLEM J.), EFFER (DONALD B.), GROVES (LAURENCE K.) e MORACA (PATRICK P.) KOLFF et al. — Elective Cardiac Arrest With Potassium Citrate During Open-Heart Operations. J.A.M.A. Vol. 164, n.º 15 p. 1 653, August 1957.
- 35) LANG (ERICH K.) e SABISTON (DAVID C.J.). — Coronary Arteriography in Selection of Patients for surgery. Radiology. Vol. 76, n.º 1, p. 32, January 1961.
- 36) LAUBRY (CH.), SOULIÉ (P.). — Les Maladies des Coronaires. Vol. 1.º , p. 9, 1950.
- 37) LUMB (GEORGE D.). M.R.C.P., F.C.A.P., e HARDY (LAWRENCE B.). — Collateral Circulation and survival Related to Gradual Occlusion of Right Coronary Artery in the Pig. Circulation. Vol. XXVII n.º 4 Part. two p. 717, April 1963.
- 38) OLIVEIRA (CORREIA), MOSINGER (MICHEL) e CARDOSO (HEMÉNIO) — Sur l'Apoplexie Cérébrale et les Troubles Vasculaires Cérébraux Notamment L'Hémorragie cérébrale Spontanée et Espérimental. — Rôle Préventif Du Ganglioplégique Largactil. — Folia Anat. Univer. Cominbr., XXVIII, (7): 16 pág., Coimbra, 1954.
- 39) PINET (F.), FREDENUCCI (R.) e MALMEJAC (CL.). — L'Artériographie des Coronaires. Possibilités Actuelles. J.A.M.A., n.º 71, p. 3 549, December, 1961.
- 40) ROSS (RICHARD S.). — Clinical application of Coronary Arteriography. Circulation. Vol. XXVII, n.º 1, p. 107, January, 1963.
- 41) SEWELL (WILLIAM H.). — Application to Coronary Arterias of the Basic Principles Governing the Development of Collateral Arterial Channels. Circulation. Vol. XXVII, n.º 4, Part. two p. 705, April 1963.
- 42) SILVESTRE (A. MELIÇO). — Aspectos Médico-Sociais das Doenças Córdio-vasculares: Coimbra Médica, Vol. VII, Fas. VIII, p. 849, Setembo-Outubro 1961.
- 43) SPAIN (DAVID M.), Bradess (Victoria A.), ISAL (PEDRO) e CRUZ (ANTONIA). — Intercoronary Anastomotic Channels and Sudden Unexpeted Death

from Advanced Coronary Atherosclerosis. *Circulation*. Vol. XXVII, n.º 1, p. 12, January, 1963.

- 44) TRINCÃO (RENATO), CARDOSO (HERMÉNIO e BELA (MATOS) — Coarctação Ístmica Completa da Aorta. Trifurcação da Artéria Pulmonar. Diversas Anomalias Cardíacas. — *Folia Anat. Conimb.*, XXXV, (6), 28 pág., 7 grav., Coimbra, 1961.
- 45) WERTHEIMER (P.), Bouchet (A.). — Traitment Chirurgical des Coronarites. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*. (A. Laffont e F. Durieux.). Vol. Coeur 11 030 R¹⁰, p. 1, 1963.

1. A Joint Annual General Meeting of the Association of Agricultural Chemists, London, 1953.
 2. J. & J. 12 January 1953.
 3. J. & J. 12 January 1953.
 4. J. & J. 12 January 1953.
 5. J. & J. 12 January 1953.

6. J. & J. 12 January 1953.
 7. J. & J. 12 January 1953.
 8. J. & J. 12 January 1953.
 9. J. & J. 12 January 1953.
 10. J. & J. 12 January 1953.

11. J. & J. 12 January 1953.
 12. J. & J. 12 January 1953.
 13. J. & J. 12 January 1953.
 14. J. & J. 12 January 1953.
 15. J. & J. 12 January 1953.

16. J. & J. 12 January 1953.
 17. J. & J. 12 January 1953.
 18. J. & J. 12 January 1953.
 19. J. & J. 12 January 1953.
 20. J. & J. 12 January 1953.

21. J. & J. 12 January 1953.
 22. J. & J. 12 January 1953.
 23. J. & J. 12 January 1953.
 24. J. & J. 12 January 1953.
 25. J. & J. 12 January 1953.

26. J. & J. 12 January 1953.
 27. J. & J. 12 January 1953.
 28. J. & J. 12 January 1953.
 29. J. & J. 12 January 1953.
 30. J. & J. 12 January 1953.

31. J. & J. 12 January 1953.
 32. J. & J. 12 January 1953.
 33. J. & J. 12 January 1953.
 34. J. & J. 12 January 1953.
 35. J. & J. 12 January 1953.

Composto e impresso na *Imprensa de Coimbra, L.da*
 Largo de S. Salvador, 1 a 3 - Coimbra



FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

(Propriété du Laboratoire d'Anatomie et de l'Institut d'Histologie et d'Embryologie)

EDITEUR: PROF. MAXIMINO CORREIA

Les FOLIA ANATOMICA VNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS publient des mémoires originaux et des études d'Anatomie descriptive et topographique, d'Anatomie pathologique, d'Histologie et d'Embryologie.

Les FOLIA rédigées en portugais sont suivies d'un résumé en français, en anglais ou en allemand, au choix de l'auteur. Les fascicules contenant, une ou plusieurs FOLIA, paraissent au fur et à mesure que les articles sont imprimés, d'après l'ordre de réception des manuscrits.

Les manuscrits adressés à la rédaction ne sont pas rendus à leurs auteurs même quand ils ne sont pas publiés.

Les communications concernant la rédaction et l'administration des FOLIA ANATOMICA doivent être adressées à M. le Prof. Maximino Correia, Laboratoire d'Anatomie, Faculté de Médecine, Coïmbre, Portugal.