
Detecção de Células Jovens no Sangue de Indivíduos Normais

Dr. Emmanuel Rebello *

I – INTRODUÇÃO

Trabalhando há vários anos em laboratório e quase sempre na especialidade de hematologia, notamos por algumas vezes aparecimento de células jovens numa microscopia de uma distensão sanguínea. Na decorrência destes achados esporádicos, que não são meus e sim do domínio da especialidade, existe uma regra já tradicional: "Quando se achar, na microscopia de uma distensão sanguínea, um elemento estranho ou jovem, deve-se eliminá-lo do cômputo da contagem específica".

Ficamos sempre julgando que com uma quantidade maior de sangue poderíamos achar maior número de elementos jovens na corrente circulatória. Raciocinamos assim porque numa distensão de sangue usamos uma pequenina gota do mesmo e só utilizamos metade desta gota, e porque no microscópio, em rotina, só fazemos a contagem de 100 células para dar o resultado definitivo do hemograma em percentual.

Nosso raciocínio em face deste fato foi sempre acumulado de novas experiências, no decorrer do nosso trabalho diário, pois de nossa experiência no Instituto Nacional de Câncer, na lida diária com linfomas, leucemias e doenças afins, solidificamos nosso conceito de que "existem realmente elementos jovens na corrente circulatória de indivíduos sãos, tudo dependendo da quantidade de sangue examinado e do método de concentração de leucócitos usados".

Posteriormente, em 1961, trabalhando com microscopia ultravioleta com auxílio de Acridine Orange como corante fluorescente, na pesquisa de células neoplásicas no sangue circulante (que motivou em 1962 uma publicação nossa a respeito) (37), tivemos oportunidade de examinar mais de 3 centenas de sangues entre indivíduos saudáveis e doentes. Houve mesmo uma vez que, ao examinar os sangues de todos os funcio-

* Médico Patologista Clínico do Instituto Nacional de Câncer

nários do laboratório de Patologia Clínica do Instituto Nacional de Câncer, verificamos que todos (100%) eram positivos para células jovens (no caso células neoplásicas), ou melhor, ricas em ácido ribonuclêico. Todos estes funcionários, em número de 32, até hoje vivem sem nenhuma sintomatologia sugestiva de qualquer tipo de neoplasia e já se passaram 14 anos.

Todas estas experiências juntas, acrescidas da presença de eritroblastos nestas microscopias, em indivíduos sem anemias, nos levaram a efetivamente estudar a hemato-poiese e suas regras, em relação à nossa opinião anterior.

De início deparamos com o clássico conceito de que, em indivíduos sadios, a medula óssea não deixa passar elementos jovens para a circulação periférica. Este conceito é tão clássico e ao mesmo tempo respeitado que, na última publicação de Bernard e Bessis (3), eles assim se expressam:

“A partir do momento em que a diferenciação tem lugar, ou melhor dizendo, quando aparecem os primeiros caracteres que demonstram a orientação definitiva da célula, ela sofre uma maturação que a transforma em elemento maduro, **o único que em estado normal pode passar ao sangue circulante**”.

Também o quadro sinótico da maturação das células sanguíneas de quase todos os tratados de Hematologia mostra os elementos de acordo com a fase, seja medular ou seja sanguínea (11, 17, 18, 19, 22, 24, 26, 30, 39, 40, 41, 44, 45 e 46).

Estas tradicionais constatações são frontalmente contra nossa opinião a respeito dos elementos jovens presentes na corrente circulatória. Por outro lado, até o presente momento, pouco se sabe sobre hemato-poiese, isto é, diferenciação e maturação das células sanguíneas. Neste terreno o me-

canismo é obscuro e a notação celular é confusa, sendo por vezes sinonímia a descrição de diversos tipos de células como originárias ou precursoras das células sanguíneas.

No livro de J. Bernard e M. Bessis, edição de 1960 (3), eles anunciam assim o problema de filiação e maturação das células: “Quase nada sabemos sobre a causa da diferenciação e maturação das células sanguíneas. Ignoramos por completo o mecanismo que determina a transformação de uma célula indiferenciada em glóbulo vermelho, em glóbulo branco ou em plaqueta. Os hematologistas conceberam grandes esperanças quando foram possíveis os cultivos da medula óssea, mais a possibilidade de averiguar a causa da diferenciação das diferentes linhas sanguíneas, assim como sua origem, valorizando os resultados obtidos com a adição ou supressão de certas substâncias e criando modificações do ambiente “in vitro”, no entanto, até o momento as esperanças não foram realizadas”.

Concernente a esta dúvida que ainda persiste em nossos dias, resolvemos estudar o problema e explanar nossos achados no trabalho que segue.

II – MATERIAL E MÉTODOS

Nós empregamos, inicialmente, para a concentração das células, a técnica do fibrinogênio bovino para a sedimentação dos eritrócitos (42,43). Posteriormente, após os estudos de um de nossos assistentes (LOBO LEITE, M.) (36), passamos a trabalhar com o método da ampulheta, que consiste no uso de 10ml de sangue com anticoagulante (Heparina) e nos orientamos segundo o cálculo na prévia determinação do hematócrito. Submetida a ampulheta à centrifugação, temos depois o sangue dividido da seguinte maneira: eritrócitos na parte infe-

rior, leucócitos na parte afilada e plasma sobrenadante na parte superior da ampulheta. O sobrenadante é desprezado e, por intermédio de uma pipeta de Pasteur, a camada de leucócitos é retirada e depois distendida numa lâmina para impregnação pela Acridine Orange, pelo método original de Bertalanffy (4) com modificações (23, 25, 27).

Nós fizemos uma modificação da concentração da Acridine Orange seguida de observação ao microscópio. O aparelho de fluorescência com que trabalhamos é o microscópio da casa Zeiss equipado com a lâmpada de mercúrio OSRAN HBO 200, que funciona ao máximo de pressão de vapor de mercúrio a 200 Watts, com a densidade luminosa de 25.000 Stibb, com filtro luminoso de 9500 lumens e empregando um filtro de excitação de cristal (Schott BG 12) (Fig. 1).

Usamos o microcentrifugador da casa Internacional, com aparelho para leitura; ampulhetas de vidros Pirex feitas sob encomenda. Como anticoagulante usamos heparina.

Mecanismo de fluorescência: (4, 31, 33).

A fixação da AO no citoplasma celular depende do conteúdo de ácido nucléico e sobretudo do ácido ribonucléico (RNA) das células jovens. A fluorescência vermelha é diretamente proporcional à quantidade do RNA citoplasmático na célula jovem, ligada à síntese das proteínas.

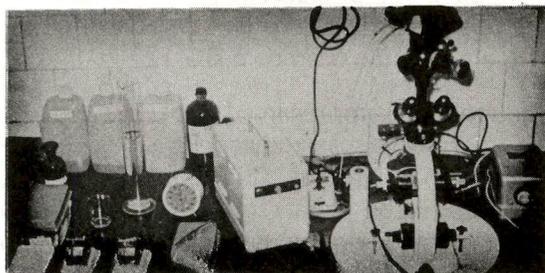


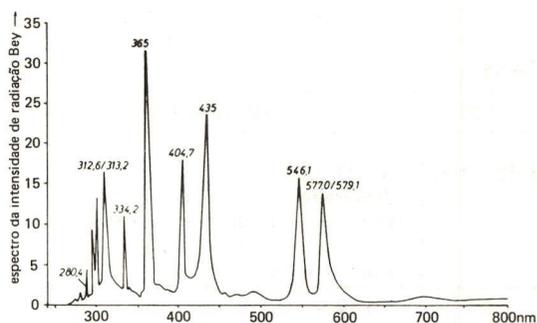
Fig. 1 — Microscópio Zeiss equipado com luz ultravioleta e microfotografia. Vemos ainda a bateria de coloração.

Utilizando este método, as células jovens são identificadas por uma fluorescência vermelho-fogo no citoplasma (com um pequeno halo incolor em torno do núcleo).. Os núcleos são verde-amarelado (DNA) e os nucléolos se identificam com o citoplasma.

Os leucócitos se identificam pela coloração, ou melhor dito, pela variação de cor da fluorescência do vermelho-fogo ao vermelho-pardo, correspondendo à variação do leucócito jovem ao leucócito maduro.

O sistema ótico para a microscopia de fluorescência refere-se mais à iluminação do que propriamente ao microscópio (9).

É necessário uma fonte de luz excitadora de grande intensidade, capaz de emitir luz visível e ultravioleta. As lâmpadas são de vapor de mercúrio com bulbo de quartzo. A lâmpada HBO—200, Osran, cujos máximos situam-se, na maioria, entre 300 m μ ' e 450 m μ , isto é, nas regiões do ultravioleta, próximo do violeta e azul (Gráfico 1).



1 Espectro de emissão da super pressão da lâmpada de mercúrio HBO 200W (nm = m μ)

TABELA 1

Combinações de filtros.
Principais combinações dos filtros excitadores com os de barreiras.

Filtro excitador	I BG 12	II BG 3	III UG 5	IIII UG 1
Filtro de barreira	53/44	50/44	47/-65	41

Para seleccionar os comprimentos de onda da radiação excitadora, usam-se filtros denominados "excitadores", permeáveis às radiações de altas frequências e opacos às radiações de maiores comprimentos de onda. A intensa radiação calorífera da lâmina é também interceptada por filtros adequados (BG, 38), a luz excitadora é dirigida ao condensador do microscópio e ao preparado por meio de espelho metalizado, não absorvente de ultravioleta e resistente a seus efeitos. Tornando fluorescente o preparado, o feixe de luz que sobe pelo sistema ótico, em direção ao observador, consiste não só de luz ultravioleta, mas também de luz fluorescente. Estas devem ser então separa-

das, impedindo-se a passagem da luz ultravioleta e permitindo-se que apenas a fluorescente continue até a ocular do microscópio, o que se consegue por meio de filtros "barreira". Estes filtros são permeáveis à luz de curtos comprimentos de onda e transparentes às radiações mais longas e são colocados entre o preparado e o observador. A tabela 1 mostra a recomendação da casa Zeiss.

Podem-se utilizar dois tipos de filtros excitadores: os filtros permeáveis apenas à radiação ultravioleta, do tipo UG e aqueles transparentes ao ultravioleta, violeta azul, do tipo BG, demonstrados no Gráfico nº 2 e especificados na tabela 2.

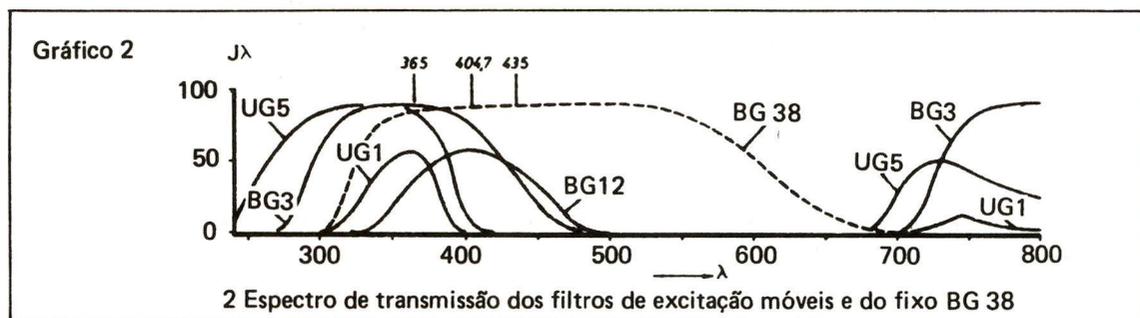


TABELA 2

Slide	Filtro excitador
Filtro fixo	BG 38/2,5 Sempre fixo no foco da luz. Diminui ou suprime os distúrbios dos raios vermelhos no fundo. Absorve calor.
I	BG 12/4 Absorve completamente a radiação vermelha.
II	BG 3/4 Grande transmissão de luz. Curva de excitação de curta duração e subida íngreme.
III	UG 5/3 Transmite quase exclusivamente ultravioleta
IIII	UG 1/3 Transmite apreciável quantidade de luz.

No gráfico 2 — Aham-se esquematizadas curvas de transmitância de alguns destes filtros. Ainda que opacos a radiações mais longas, os filtros de ambos os tipos podem apresentar certa permeabilidade a tonalidades vermelhas. A coloração vermelha então assumida pelos preparados pode ser iluminada por meio de filtros auxiliares. No trabalho em questão usamos o BG 12.

Quando se empregam filtros excitadores BG permeáveis às radiações visíveis, é preciso utilizar filtros "barreira" coloridos, isto é, filtros capazes de interceptar não apenas o ultravioleta, mas também o violeta e o azul.

Estes são filtros amarelos ou de cor laranja, permeáveis somente à luz de comprimento

de onda maior do que 500 m μ (filtro Zeiss 50) ou 530 m μ (filtro Zeiss 53). No nosso trabalho usamos os filtros de barragem 50 e -65.

Quando se usam filtros UG, basta empregar

filtros "barreira" incolores, impermeáveis apenas aos raios ultravioleta transparentes, de comprimentos de onda maiores do que 410 m μ (filtro Zeiss 41). Curvas de transmitância destes filtros são vistas no gráfico 3 e especificadas na tabela 3.

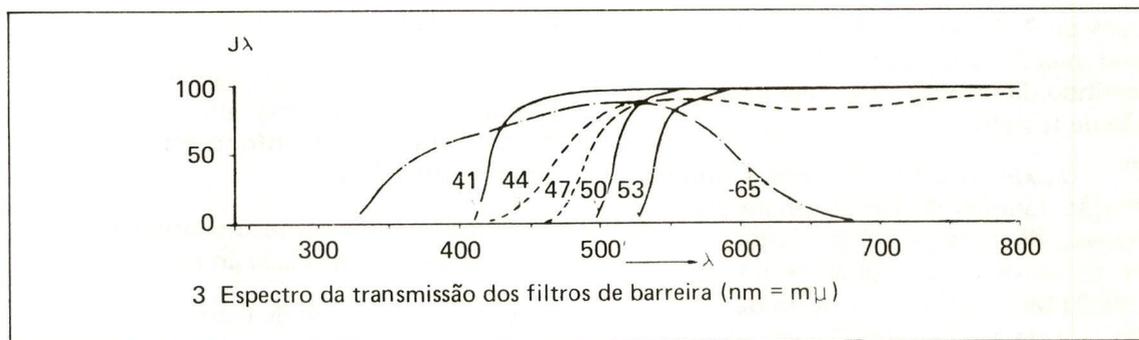


TABELA 3

Slide	Filtro de barreira
Superior	Livre, 53, - 65
Médio	Livre, 47, 50
Inferior	Livre, 41, 44

Esquemmatizando o sistema de iluminação por nós usado temos: Filtro excitador BG 12 (fig. 2) e filtros de barreira 50 e -65 (fig. 3).

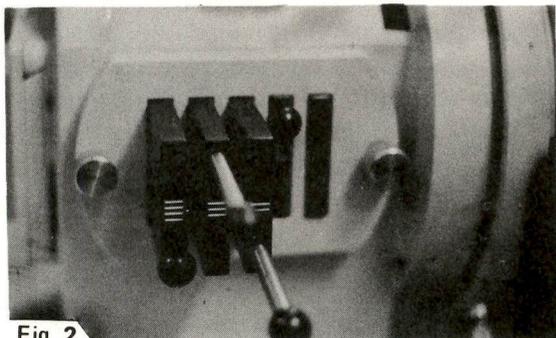


Fig. 2



Fig. 3

Com este sistema iluminamos toda a radiação vermelha, posto que a nossa fluorescência é vermelha, segundo a técnica da Acridine Orange.

Técnica:

O método da fluorescência para células jovens (8), pela A.O. é efetuado em 6 fases, segundo o original de Bertalanffy:

1.º – Feitos os esfregaços com os leucócitos concentrados pelo método já citado, fixar por 5 minutos numa solução de álcool – éter em partes iguais.

2º — Mergulhar em água destilada e, logo após, em uma solução de ácido acético a 1% durante 1 minuto, tornando a passar em água destilada.

3º — Corar os esfregaços durante 3 minutos na Acridine Orange. Prepara-se uma solução stock de A. O. a 0,1% em água destilada e uma solução de uso para coloração a 0,01%, partindo da solução stock, em solução tampão de fosfato.

4º — Deixar os esfregaços por 1 minuto na solução tampão de fosfato, para eliminar o excesso de corante. Nesta solução podem ser deixados várias horas, se necessário. A solução tampão é uma mistura de M/15 Na₂HPO₄ e de M/15 KH₂PO₄ em água destilada, ajustada ao pH₆.

5º — Diferenciar os esfregaços mergulhando-os 3 a 4 vezes (a técnica original requer 1 a 2 minutos) em M/10 CaCl₂, para que os dois ácidos nucléicos, o RNA e o DNA sejam claramente diferenciados.

6º — Passar novamente os esfregaços na solução tampão, recobrir as lâminas molhadas com uma lamínula, secar ligeiramente com papel de filtro e examinar no microscópio de fluorescência. Depois do exame estas lâminas podem ser descoradas, mergulhando-as por alguns minutos em álcool — éter a 50%, e coradas pelos métodos usuais em hematologia.

III — CASOS ESTUDADOS — ESTATÍSTICA

No ano de 1961, nós trabalhamos no Instituto Nacional de Câncer (1, 6, 14, 15, 20), onde fizemos os mais variados estudos com grupos de doentes e indivíduos sãos. Assim sendo, citamos abaixo os distintos grupos:

1º Grupo — 50 doentes portadores de câncer avançado com metástases generalizadas.

2º Grupo — 250 doentes portadores de diferentes tipos de câncer (verificados histologicamente).

3º Grupo — 90 indivíduos assintomáticos recrutados entre estudantes de medicina, doadores de sangue e funcionários do laboratório (idade de 20 a 30 anos).

4º Grupo — Leucemias (aguda e crônica) e linfomas (linfossarcoma, retículo sarcoma, doença de Hodgkin, linfoma macrolifocitário e micose fungóide).

5º Grupo — 20 doentes do ambulatório de ginecologia de prevenção ao câncer.

6º Grupo — Material de medula óssea.

7º Grupo — 10 portadores de câncer avançado da mama, com metástases generalizadas. Sangue retirado de 3 em 3 horas, durante 72 horas, sem interrupção (34).

8º Grupo — Células retiradas do tumor de doentes autopsiados, como padrão positivo de células ricas em RNA.

Este trabalho, realizado em 1961, foi a base do trabalho que ora apresentamos. De todos esses 8 grupos, somente o grupo 3 é o que interessa no momento. Nos indivíduos deste grupo, encontramos eritroblastos (na ausência de anemia), mieloblastos e linfoblastos (na ausência de leucemia), plasmócitos (na ausência de mieloma).

O percentual de positividade foi bastante alto neste grupo, quando mantivemos a mesma concentração da Acridine Orange pelo método original de Bertalanffy.

Em 1969, resolvemos esclarecer, definitivamente, o problema das células jovens no sangue circulante. Para isso, utilizamos 90 indivíduos independentes do sexo, recrutados entre funcionários, estudantes e doadores de sangue. O material foi colhido, parte

no Instituto Fernandes Figueira, parte em Laboratórios particulares e parte no Hospital do Andaraí – INPS.

Este material nos mostrou uma positividade de 68%, o que afirma o mérito do método.

As células aqui encontradas, coradas pela Acridine Orange, identificadas pelo vermelho-fogo do citoplasma, foram descoradas e coradas pelo método de Pappenheim (May Grunwald-Giemsa), conforme constatação feita no capítulo de documentação fotográfica, onde inclusive classificamos a linhagem, quando possível, da célula jovem.

IV – DOCUMENTÁRIO FOTOGRÁFICO

Inicialmente, colhemos sangue dos pacientes, usando heparina, como anticoagulante

e, imediatamente, fazemos rodar o micro-hematócrito, após o que escolhemos a ampulheta a usar e, sem perda de tempo, fazemos também rodar a ampulheta, a fim de que seja o mais curto possível o tempo entre a retirada do sangue e a obtenção do concentrado de células. Quanto mais demorada for esta etapa, piores serão os resultados.

Usamos para microfotografia aparelhagem e microscópio Zeiss. Filme Ektachrome-High Speed 160 ASA. Day Light. Microfoto de fluorescência com filtro de excitação I (BG 12) e de barreira 50-65; objetiva 40, ocular KPL 8. Diafragmas abertos com exposição, para fotos aproveitáveis de 5 segundos. Outras microfotografias foram feitas com a mesma aparelhagem, filme e exposição normalmente fotometrada.

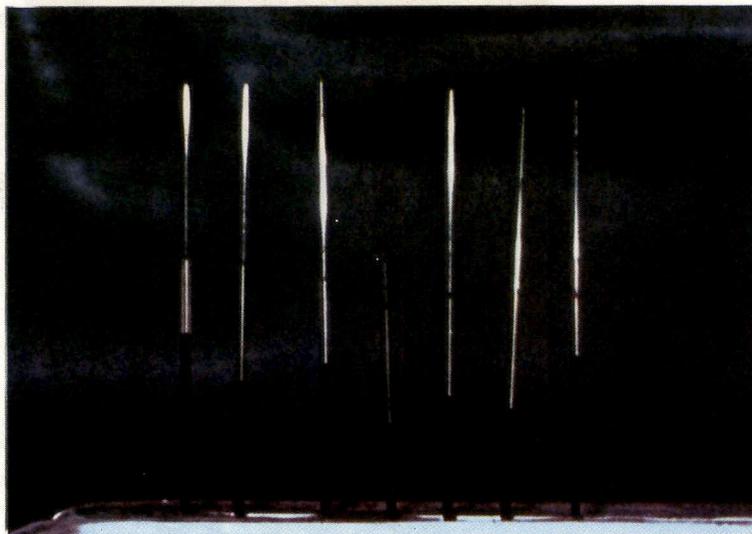


Fig. 4 – Série de micro-hematócritos após centrifugação.

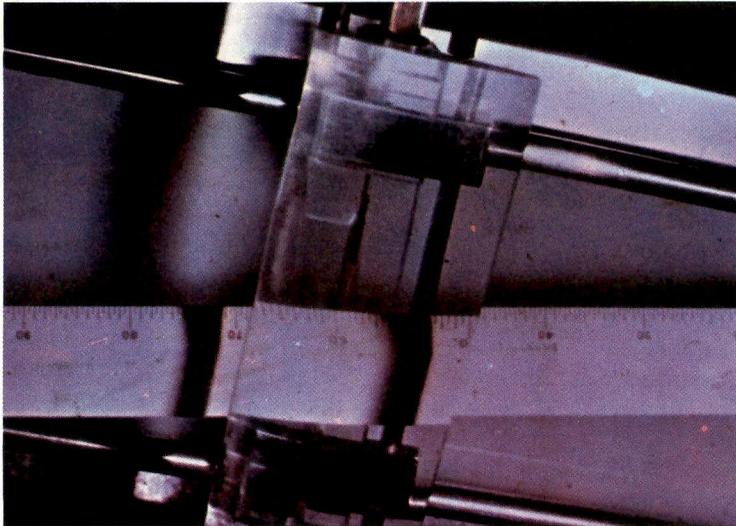


Fig. 5 — Leitura do micro-hematócrito em aparelhagem complementar ao centrifugador.



Fig. 6 — Ampulheta após centrifugação de 30 minutos a 2.000 r.p.m. Vemos distintamente a separação de eritrócitos no fundo e no terço inferior da parte afilada. Concentrado de leucócitos no meio da parte afilada e plasma sobrenadante no restante da ampola. Vemos nitidamente o n.º 43 no alto, o que indica o hematócrito previamente determinado.

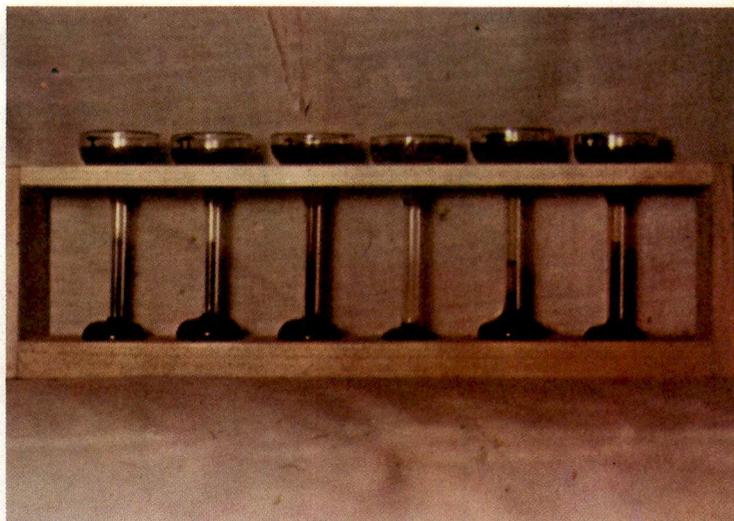


Fig. 7 — Estante com 6 ampulhetas todas elas mostrando nitidamente o concentrado de leucócitos.



Fig. 8 — Vemos células com graus diferentes de fluorescência, variando do vermelho ao rosa e ao verde (obj. 10x).

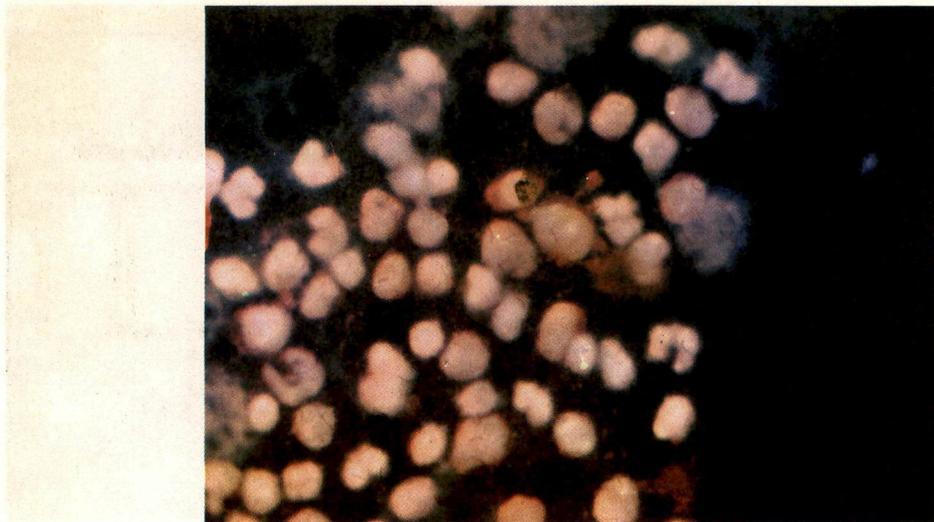


Fig. 9 — Microfoto, com maior aumento, da foto anterior, onde podemos ver o citoplasma vermelho-fogo de algumas células (Obj. 40x).

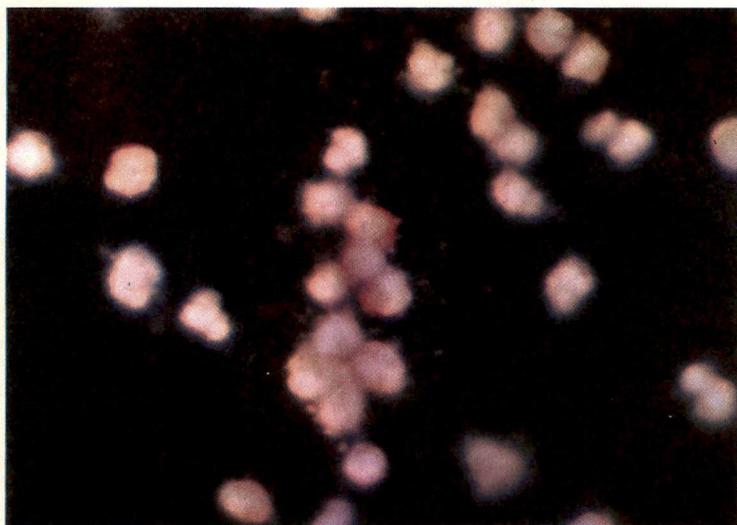


Fig. 10 — Microfoto demonstrando ainda a intensidade fluorescente diretamente proporcional ao grau de imaturidade celular (Obj. 40x).

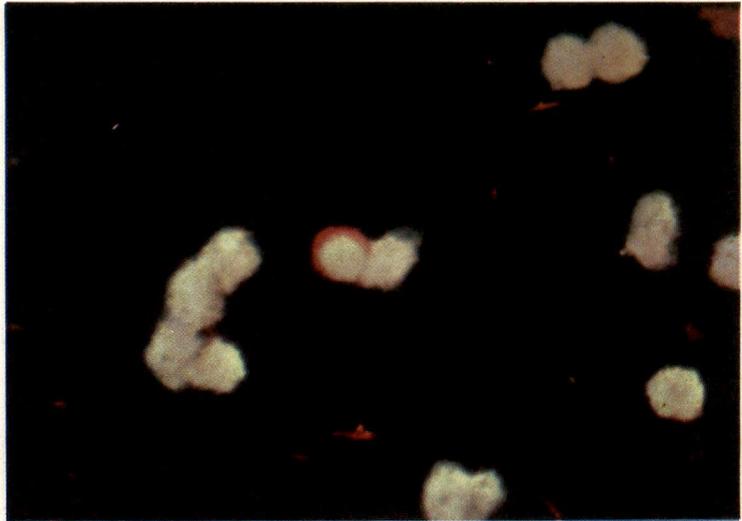


Fig. 11 — Detalhe de uma célula com citoplasma mostrando intensa fluorescência vermelho-fogo, ligado diretamente ao teor de RNA e ao grau de imaturidade da célula (Obj. 40x).

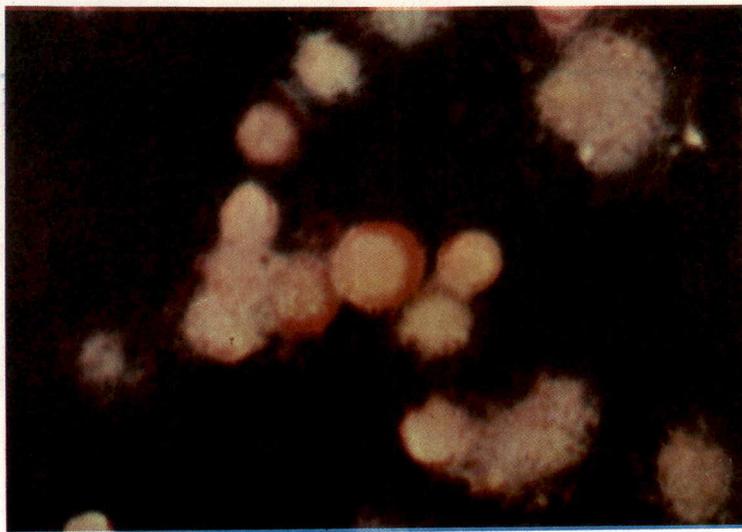


Fig. 12 — Outro detalhe como na fotografia anterior (Obj. 40x).

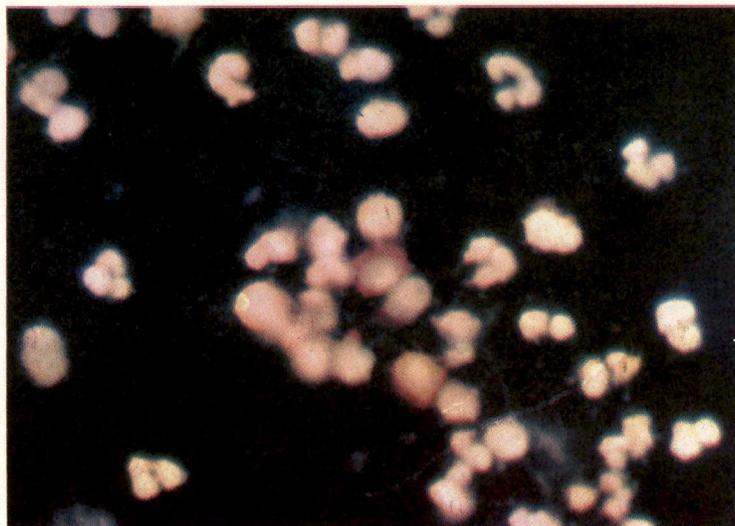


Fig. 13 — Detalhe de maturação de células no concentrado de leucócitos, onde vemos desde células jovens (vermelho-fogo) até células maduras (verde-amarelado) (Obj. 40x).

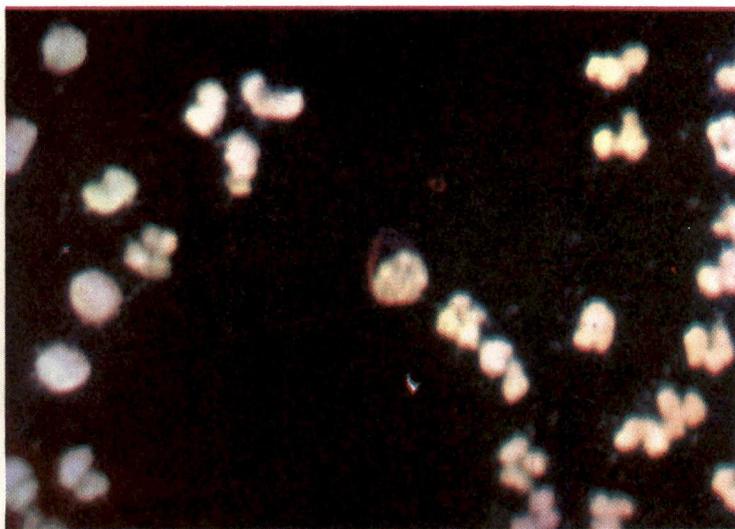


Fig. 14 — No centro da microfotografia vemos uma célula com citoplasma rico em RNA, demonstrado pela fluorescência vermelha. Talvez uma célula plasmática (Obj. 40x).

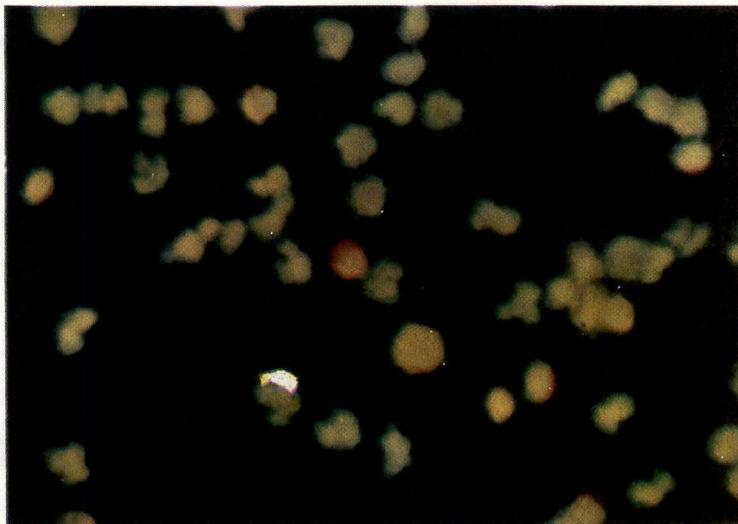


Fig. 15 — No centro da microfotografia vemos uma célula jovem apresentando intensa fluorescência vermelho-fogo, possivelmente trata-se de um eritroblasto basófilo (não nos foi possível identificar) (Obj. 40x).

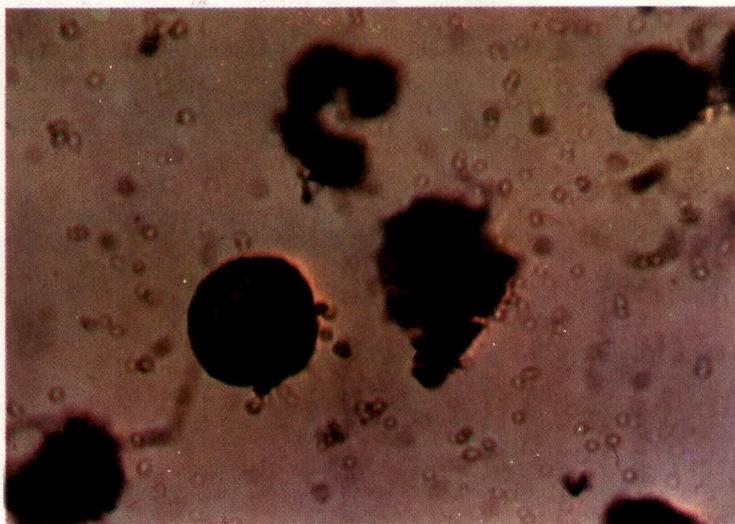


Fig. 16 — Vemos um pouco desviado do centro, para baixo e para a esquerda, um eritroblasto basófilo, porém, não pudemos identificá-lo com a figura acima (coloração May Grunwald-Giemsa). (Obj. 40x).

Muitas vezes, após microscopia de fluorescência, logramos descolorar a lâmina em álcool — éter e recorá-la pelos corantes comuns de hematologia, a fim de comprovar citologicamente o achado anterior. Por vezes, devido à demora da feitura das lâminas, os preparados não se prestam a uma nova coloração. As microfotografias abaixo servem para comprovar um achado de fluorescência e, posteriormente, a mesma célula corada pelo May Grunwald-Giemsa.

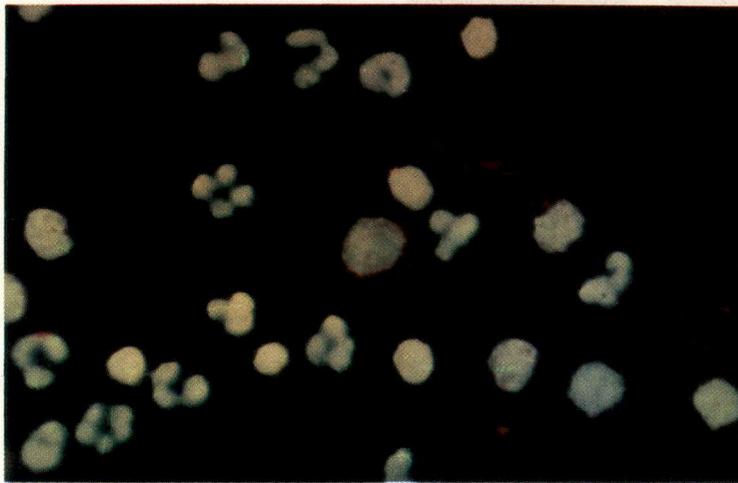


Fig. 17 — No centro da microfotografia vemos uma célula jovem, com citoplasma rico em RNA e acentuada fluorescência vermelha, correspondente à imaturidade da célula. (Obj. 40x).

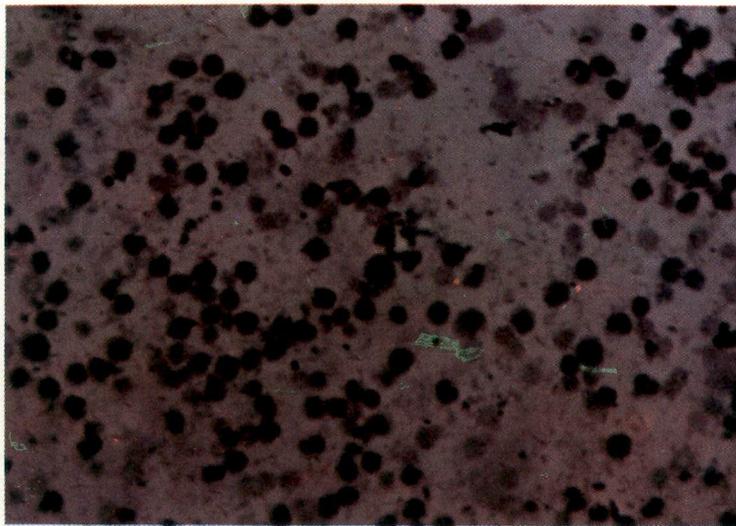


Fig. 18 — No centro da microfotografia vemos, em pequeno aumento, a célula mostrada na figura anterior. Esta foto serve também para mostrar a riqueza celular do preparado feito pelo método da ampulheta (Obj. 10x) (Col. May Grunwald Giemsa).

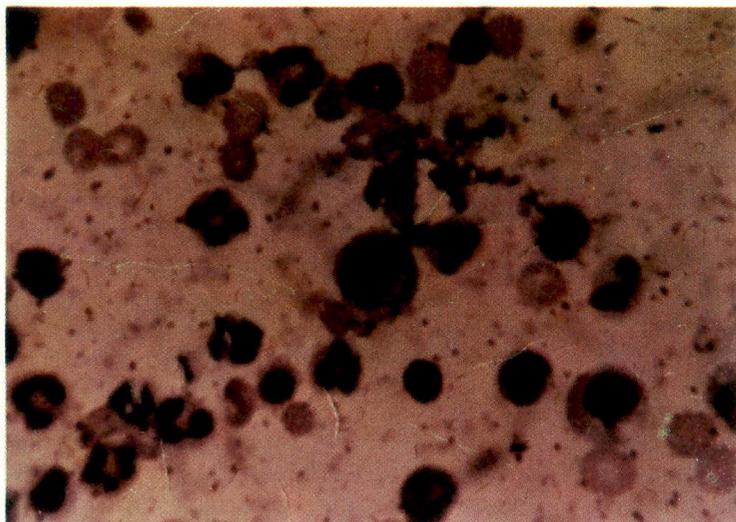


Fig. 19 — No centro da microfotografia vemos a mesma célula das figuras 17 e 18. Podemos perfeitamente identificá-la pelas células que a circundam (ver posição de células idênticas nas 3 fotografias.) (Obj. 40x) (Col. May Grunwald — Giemsa).

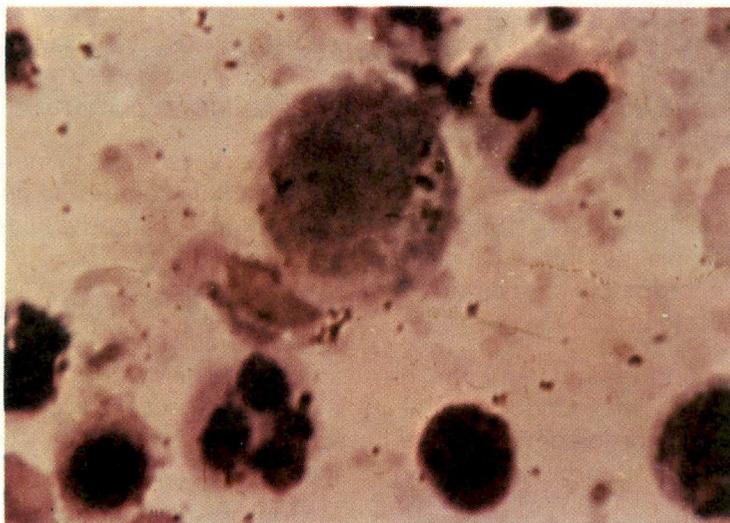


Fig. 20 — A mesma célula das figuras 17, 18 e 19 em grande aumento (imersão) (Obj. 100x), onde podemos identificar tratar-se de um mielócito. A comparação das 4 microfotografias com a disposição das outras células servirá perfeitamente para comparar a afirmação aqui feita (Col. May Grunwald-Giemsa).

V – COMENTÁRIOS

A identificação morfológica da célula jovem é às vezes difícil, por intervenção de vários fatores, que serão descritos em seguida. Nós acreditamos que a identificação das células depende, em grande parte, da execução da técnica em todos os seus detalhes, podendo, portanto, este trabalho ser repetido por outros Autores para efeito de confirmação.

A diferenciação da célula hematológica jovem das células cancerosas e de outras células desconhecidas, difíceis de classificar, depende unicamente de critérios pessoais do pesquisador.

Os métodos de concentração celular, cada dia mais aperfeiçoados (como o que apresentamos), revelam não somente células hematológicas e neoplásicas, como também outras de origem desconhecida, donde uma perfeita identificação ainda não é

possível, pois não se encontram nos melhores Atlas de Hematologia e Citologia, citados por Alexandre e Kuper (1).

O critério para diferenciar uma célula jovem de uma célula cancerosa no sangue circulante é difícil de estabelecer, tanto com Acridine Orange, como com os corantes de Romanowsky, pois a relação núcleo-citoplasma e a presença de nucléolos são características de ambas.

As células neoplásicas que se destacam dos tumores de origem penetram na corrente sanguínea, tomando a forma esférica (idêntica a todas as outras células do sangue) devido à pressão que é exercida igualmente em todos os sentidos na corrente sanguínea. Outro fato que contribui para a semelhança de tamanhos destes dois tipos de células é a passagem das mesmas nas redes capilares, o que determina um menor volume da célula neoplásica.

VI – RESUMO

— Trata-se de um método simples de fácil execução, ideal para os estudos hematológicos.

— A presença de células jovens foi detectada pela microscopia de fluorescência e confirmada pela microscopia com os corantes da rotina hematológica.

— Foram achados indiferentemente linfoblastos e mieloblastos em indivíduos clinicamente sadios, de acordo com a característica morfológica admitida.

— A presença de eritroblastos foi evidenciada em indivíduos sãos e com série vermelha normal.

— A presença de psasmócitos foi registrada em indivíduos sãos, na ausência de mielo-

ma e de doença por vírus.

— A diferença entre hematopoese normal e extra medular é questão puramente quantitativa e não qualitativa, como se acreditava anteriormente.

— O método de concentração de leucócitos por nós usado, ou seja, o método da ampulheta, tem várias outras aplicações, como sejam: concentração para células L.E.; eritrócitos parasitados, concentração de medula óssea, etc.

— Com a utilização do método de concentração da ampulheta, usando 10 ml de sangue, conseguimos demonstrar o nosso objetivo, que consiste em provar a presença de células jovens no sangue circulante de indivíduos normais.

VI – SUMMARY

This is a simple method, easy to apply, which is an ideal one for hematologic studies.

The presence of young cells was detected by fluorescence microscopy, with the dyes of the hematologic routine.

Both lymphoblasts and mieloblasts have been found, indiscriminately, in clinically sound individuals, according to the adopted morphologic characteristic.

The presence of eritroblasts has been evidenced in sound individuals having a normal red series.

The presence of plasmocytes was recorded in sound individuals, in the absence of mie-

lome and of virus diseases.

The difference between normal and extra marrow hematopoiesis is a purely quantitative matter, and not qualitative, as it was believed previously.

The method of leucocyte concentration used by us, that is the "sand-clock" method, has many other applications, such as: concentration for L. E. cells, eritrocites attacked by parasites, concentration of bone marrow, etc.

By using the "sand-clock" method, with 10 ml of blood, we succeeded in demonstrating our objective, which is that of proving the presence of young cells in the circulating blood of normal individuals.

VII – BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, R.F. and SPRIGGS, A.I. — The differential diagnosis of tumour cells in circulating blood. *J. Clin. Path.* 13: 414, 1960.
- ASKANAZY, M. KNOCHENAMARK, em Henke, F. und Lubarsch, O. *Handbuch der Speziellen pathologischen Anatomie*. Berlin, Julius Springer, Vol. L, 2ª parte, 1927.
- BERNARD, Y. BESSIS, M. — *Hematologia Fundamental*. Edição espanhola TORAY — MASSON S.A. 1965 (Tradução do original em francês).
- BERTALANFFY, F.D. — Diagnostic reliability of the acridine orange fluorescence method for cytodiagnosis of cancer. *Cancer Res.* 21, April 1961.
- BESSIS, M. — Ultra-estructura de la celula. *Monografias*. SANDOZ.
- BESSIS, M. and DAUSSET, J. — Étude critique des remissions au cours des leucémies traitées par exsanguine transfusions. *Rev. d'Hemat.* 5: 188, 225, 1960.
- BOVER, G.F. *Atlas de citologia sanguínea (Citomorfologia, citoquímica y citogenética)*. Ediciones Toray S.A. Barcelona 1963.
- BOVER, G.F. — *Atlas de Histopatologia de las Enfermedades de 1ª sangre*. Editorial Saber — Espanha 1956.
- CAMARGO, M.E. — *Introdução às Técnicas de imunofluorescência*. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 1968.
- CUSTER, R.P. — *An atlas of the Blood and Bone Marrow*, Saunders Co. Philadelphia, 1949.
- DACIE, J.V.Y. Lewis, S.M. — *Hematologia Prática* (Tradução da 3ª Edição inglesa).
- DAMESHEK, W. (USA) — *Endocrine regulations of the hematopoieses*, Relato oficial da 1ª Reunião Científica, 22 de setembro de 1952. IV Congresso Internacional de Hematologia, Argentina.
- DAMESHEK, W. — Editorial — ACTH and its hematologic impact. *Blood* 5: 799, 1950.
- DAMESHEK, W. and GUNZ, F. — *Leucemia*. Segunda Edição. Grune & Stratton. New York 1964.

15. ENGEL, H.C. — Cancer cells in the blood: A five to nice year follow up study. *Annals of surgery* 149 (4) April 1959.
16. FOELER, W.M. — Hematology — 2ª edição revisada — Paul B. Hoeber Inc. New York 1949.
17. GUYTON, A.C. — Tratado de Fisiologia Médica. (Tradução do original em inglês) Editorial Guanabara Koogan S.A. Rio, 1969.
18. HADEN, R.L. — Principles of Hematology, Lea &Febiger, Philadelphia.
19. HEILMEYER, L. — Enfermidades de la Sangre, Editorial Labor S.A. Madrid 1946 (Trad. Original Alemão).
20. HEILMEYER, L. und BEGEMANN, H. — Atlas der Klinischen Hematologie und cytologie, Springer — Verlag Berlin 1955.
21. HOUSSAY, B.A. (Argentina) — Papel de la Hipofisis sobre la sangre, Hemocitopoyeses Y tejido Linfóide. Relato oficial da 1ª reunião de hematologia. Argentina. 1952.
22. KRACKE, R.R. — Diseases of the Blood, Philadelphia, J.P. Lippincott, 1941, Vol. 1.
23. KUPER, S.W.A. — Bignall, J.R. and Luckcock, E.D. — A quantitative Method for Studying Tumor cells in Blood. *Lancet* April 22, 1961.
24. LEITNER, S.J. — Bone Marrow Biopsy, J.A. Churchill Ltda. London 1949.
25. MALMGREN, R.A. and POTTER, J.F. — Cancer cells in the circulating Blood. *J. Southern Med. Ass.* 52 (11): 1359 — 1362, Nov. 1959.
26. MIALE, J.B — Laboratory Medicine Hematology — 3ª edição — The C.V. Mosby Company — Sto. Louis, 1967.
27. MITUS, W.J.; Medicinoff, I.B.; Wittesl, B. and DAMESHEK, W. Neoplastic lymphoid reticulum cells in the peripheral blood. *A Histochemical Study. Blood* 17 (2) February, 1961.
28. MOESCHLIN, S. — La puncion del Bazo. Ediciones Morata — Madrid 1952. (Tradução do original em alemão).
29. MOESCHLIN, S. (Suíça) — Nervous Regulation of the Hematopoiesis, Relato Oficial da 1ª Reunião Científica, 22 de setembro de 1952, IV Congresso Internacional de Hematologia, Argentina.
30. MOORE, C.V.Y. BROWN, E.B. — Progreso em Hematologia. Vol. II (Tradução do Original em inglês). Editorial Científico Médica-Barcelona 1968.
31. ORNSTEIN, L.; MAUTNER, W.; Davis, B.J. and TAMURA, R. New horizons in fluorescence microscopy, *J. Mt. Sinai Hosp.* 24 (6) November — December 1957.
32. OSKI, F.A.Y. Naiman, J.L. — Problemas hematológicos en el recién nacido. Volumem IV de la serie problemas actuales de la Pediatría Clínica. (Tradução do original em inglês). Editoria Científico Médica. Barcelona 1968.
33. PIMENTA DE MELLO, R. — The detection of cancer cells in peripheral blood by means of a fluerochrome-ultra violet microscopic method "O Hospital" 57 (5) maio de 1960.
34. REBELLO, E. e COUTINHO, A. — Estudo para estabelecer uma curva quantitativa de frequência de células cancerosas e circulantes. Em publicação 1970.
35. REBELLO, E. FIALHO, F.E. MACHADO, O. — Hiperplasias e Neoplasias dos órgãos linfopóéticos. *Revista Brasileira de Cancerologia* 7 (10) junho, 1953.
36. REBELLO, E. e LOBO LEITE, M. — Método para concentração de leucócitos e células neoplásicas no sangue circulante. Em publicação. 1970.
37. REBELLO, E. e ROCHA, E. — Cellules neoplásiques dans la courrant sanguine. *Acta Unio Internationali contra Cancrum* 29 (6-7) 1963.
38. RHODIN, J.A.G. — Atlas de ultraestructura (microscopia electronica de células Y Tejidos) (Tradução do original em inglês) Editorial Científico — Medica Barcelona 1966.
39. RIUS, E.C. Y VALENTI, R.F. — Diagnóstico Hematológico (Laboratório e Clínica). Editorial JIMS — Barcelona 1960.

-
40. SCHILLING, B - El quadro hematico Y su Interpretación clinica, Editorial Labon, S.A. Barcelona, 1936.
41. SMITH, C.H. - Blood Diseases of infancy and Childhood. The C. V. Mosby Company - St. Monis, 1960.
42. SPRIGGS, A.I. - A propos de la presence de cellules tumorales dans le sang. Path. Biol. 8 (21-22): 2101-2105, Nov. 1960.
43. STREET, J. - The use of leucocyte concentration methods in the hematology laboratory. The Journal of Medical Lab. Technology Jan. 1961.
44. WHITBY, L.E.H. Y BRITTON, C.J.C. - Alteraciones de la sangre. Salvat, Editores S.A. Barcelona, 1949.
45. WINTROBE, M.M. - Clinical Hematology, Lea & Fabiger. Philadelphia, 1962 (5ª Edição).
46. YOFFEY, J.M. - Quantitative cellular hematology. Charles C. Thomas - Publisher USA 1960.