

Morfologia da megacariocitopoiese esplênica em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, no final da gestação e pós-natal

Maria Rita Pacheco*, Laura Satiko Okada Nakaghi, Silvana Martinez Baraldi Artoni, Luciana Nakaghi Ganeco e Alessandra Cristina Francischini de Carvalho

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Unesp, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, km 5, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: rpacheco@fcav.unesp.br

RESUMO. Estudou-se a megacariocitopoiese esplênica em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, na fase fetal e pós-natal. Coletou-se o baço no 28º dia fetal e no 4º, 8º, 12º, 28º, 56º e 84º dia pós-natal. As células megacariocíticas apresentaram, morfológicamente, citoplasma que se alternou de escasso à abundante, variando de levemente basófilo à acidófilo com núcleos grandes, avermelhados, irregulares e cromatina variável, alternando-se de frouxa a densa. O número de nucléolos visíveis variou na dependência do padrão cromatínico, e evidenciaram atividade e seqüência megacariocitopoiética por todo o período estudado, pela presença de células maduras no 28º dia de vida fetal e no 84º dia do período pós-natal. Individualizaram-se, seqüencialmente, por megacarioblasto, promegacariócito, megacariócito cariocinético, megacariócito e metamegacariócito. Concluiu-se que a megacariocitopoiese esplênica, em coelhos, produziu plaquetas pela presença do ambiente estimulador da hemocitopoiese ou, mais especificamente, do microambiente indutor da megacariocitopoiese e trombocitopoiese.

Palavras-chave: megacariocitopoiese esplênica, coelhos.

ABSTRACT. Morphological study of splenic megakaryocytopoiesis in White New Zealand rabbits in the end of gestation and postnatal period. Splenic megakaryocytopoiesis was studied in White New Zealand rabbits in the fetal and postnatal phase. The spleen was collected at the 28th fetal day and at 4th, 8th, 12th, 28th, 56th and 84th days after birth. Morphologically, the megakaryocytic cells presented cytoplasm scarce to abundant, lightly basophilic to acidophilic, with large nucleus, reddish and irregular and variable amounts of chromatin loose to dense; the visible number of nucleoli varied depending on the chromatin pattern. It was evidenced megakaryocytopoietic activity and sequence all over the period of the study, by the presence of mature cells, in the 28th day of fetal life and in the 84th day of postnatal, presupposing a subsequent platelets production. It was individualized, sequentially, by megakaryoblast, promegakaryocyte, caryokinetic megakaryocyte, megakaryocyte and metamegakaryocyte. We conclude that splenic megakaryocytopoiesis in rabbits produced platelets by presence of stimulator environment of hemocytopenesis, or more specifically, by inductor microenvironment of megakaryocytopoiesis and thrombocytopoiesis.

Key words: splenic megakaryocytopoiesis, rabbits.

Introdução

O mecanismo capaz de reduzir a hemorragia ocasionada por uma lesão parcial ou total na parede de um vaso sanguíneo denomina-se hemostasia, sendo, portanto, um mecanismo essencial e harmônico de defesa para a sobrevivência (Gentry e Downie, 1988).

A origem das plaquetas, segundo Banks (1992a), ocorre a partir dos metamegacariócitos por um processo de exocitose, no qual elas se destacam da

superfície celular. Handagama *et al.* (1986) também verificaram processos proplaquetários de comprimento e espessura variáveis, originados a partir da superfície dos megacariócitos, que, após terem sido segmentados por constrições regionais ao longo de sua extensão proplaquetária migraram, ativamente, das proximidades da superfície do megacariócito para os sinusóides venosos, a fim de liberar plaquetas por fragmentação. Da mesma forma, Paulus e Aster (1983) revelaram que, na

plaquetogênese, milhares de plaquetas foram liberadas por megacariócito, e Harker e Finch (1969) observaram uma produção média diária de 49 plaquetas por megacariócito.

Considerando-se a relevante função das plaquetas na coagulação sanguínea, objetivou-se, com o presente trabalho, pesquisar a megacariocitopoiese esplênica, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, durante o desenvolvimento intra-uterino e pós-natal, devido também à escassez da literatura sobre a morfologia das células da linhagem megacariocítica e pela grande utilização de coelhos como animais de laboratório.

Material e métodos

Para os objetivos propostos, foram utilizadas 14 coelhas da raça Nova Zelândia Branco, que foram acasaladas com machos da mesma raça. Após 12 dias do coito, foi constatada a prenhez, por palpação abdominal, e esses animais foram mantidos em gaiolas metálicas individuais, dotadas de comedouros fixos e bebedouros automáticos, com água e alimentação *ad libitum* (ração para reprodução), durante o período experimental.

A megacariocitopoiese esplênica foi estudada na fase intra-uterina (FIU) e no período pós-natal (PPN). Para isto, duas coelhas foram sacrificadas por decaptação e o baço dos fetos coletado no 28º dia de prenhez. Outras 12 fêmeas mantiveram a prenhez e, após o parto, o mesmo estudo foi realizado em baço de láparos com 4, 8 e 12 dias; e de coelhos jovens com 28, 56 e 84 dias. Para tanto, o baço de cada animal foi fixado em solução de Bouin por 24 horas e processado, rotineiramente, para inclusão em parafina. Após a microtomia semi-seriada, a uma espessura de 5 µm, os cortes histológicos foram corados pelas técnicas do Tricrômico de Masson, em conformidade com Behmer *et al.* (1976) e observados em microscopia de luz para a identificação e descrição das células megacariocíticas. A seguir, foram elaboradas fotomicrografias em um fotomicroscópio da Olympus. A ampliação fotográfica foi de 4,56x.

Resultados

A distinção das células megacariocíticas, envolvidas na megacariocitopoiese esplênica em coelhos da raça Nova Zelândia Branco foi expressa, seqüencialmente, por megacarioblasto, promegacariócito, megacariócito cariocinético, megacariócito (célula madura sem processo proplaquetário e célula madura com processo proplaquetário) e metamegacariócito (Figura 1). As

fotomicrografias dessa série megacariocítica demonstraram, no megacarioblasto (A), citoplasma intensamente basófilo e escasso; núcleo avermelhado, grande e oval, cromatina frouxa e alguns nucléolos; no promegacariócito (B), citoplasma discretamente basófilo e abundante; dois núcleos avermelhados, grandes, reniforme à esquerda e oval à direita, cromatinas frouxas e alguns nucléolos; no megacariócito cariocinético (C), abundante citoplasma acidófilo, com algumas regiões de discreta basofilia; vários núcleos formados pela cariocinese, avermelhados, cromatinas frouxas e alguns nucléolos; no megacariócito, célula madura sem processo proplaquetário (D), citoplasma acidófilo, com algumas regiões de discreta basofilia e abundante; núcleo avermelhado, grande, multilobulado, formado pela fusão dos vários núcleos cariocinéticos, cromatina densa na maior extensão e sem nucléolos visíveis e frouxa em uma pequena área, possibilitando a visualização de um nucléolo; no megacariócito célula madura com processo proplaquetário (E), citoplasma acidófilo em sua maior parte, discretamente basófilo na região perinuclear à esquerda, abundante com processo proplaquetário acidófilo na periferia e discretamente basófilo no centro e tendendo à segmentação para liberar proplaqueta; núcleo avermelhado, não tão grande em comparação ao citoplasma, multilobulado, cromatina densa na maior extensão e sem nucléolos visíveis e frouxa em uma pequena área, possibilitando a visualização de dois nucléolos; no metamegacariócito (F), citoplasma acidófilo, com algumas regiões de discreta basofilia e abundante, apresentando proplaqueta perto da superfície celular, acidófila na periferia e discretamente basófila no centro e em processo de exocitose para formar outra proplaqueta; núcleo avermelhado, grande e multilobulado, cromatina densa na maior extensão e sem nucléolos visíveis e frouxa em uma pequena área, possibilitando a visualização de três nucléolos.

Discussão

As características morfológicas das células da linhagem megacariocítica encontradas nos resultados de nossos estudos referentes à afinidade tintorial do citoplasma e do núcleo, tamanho do citoplasma e do núcleo, bem como a irregularidade do núcleo (oval, reniforme, cariocinético e lobulado), número de nucléolos e padrão de cromatina dessas células se incluíram, de maneira geral, nos relatos de Paulus e Aster (1983), Banks (1992a) e Junqueira e Carneiro (1999).

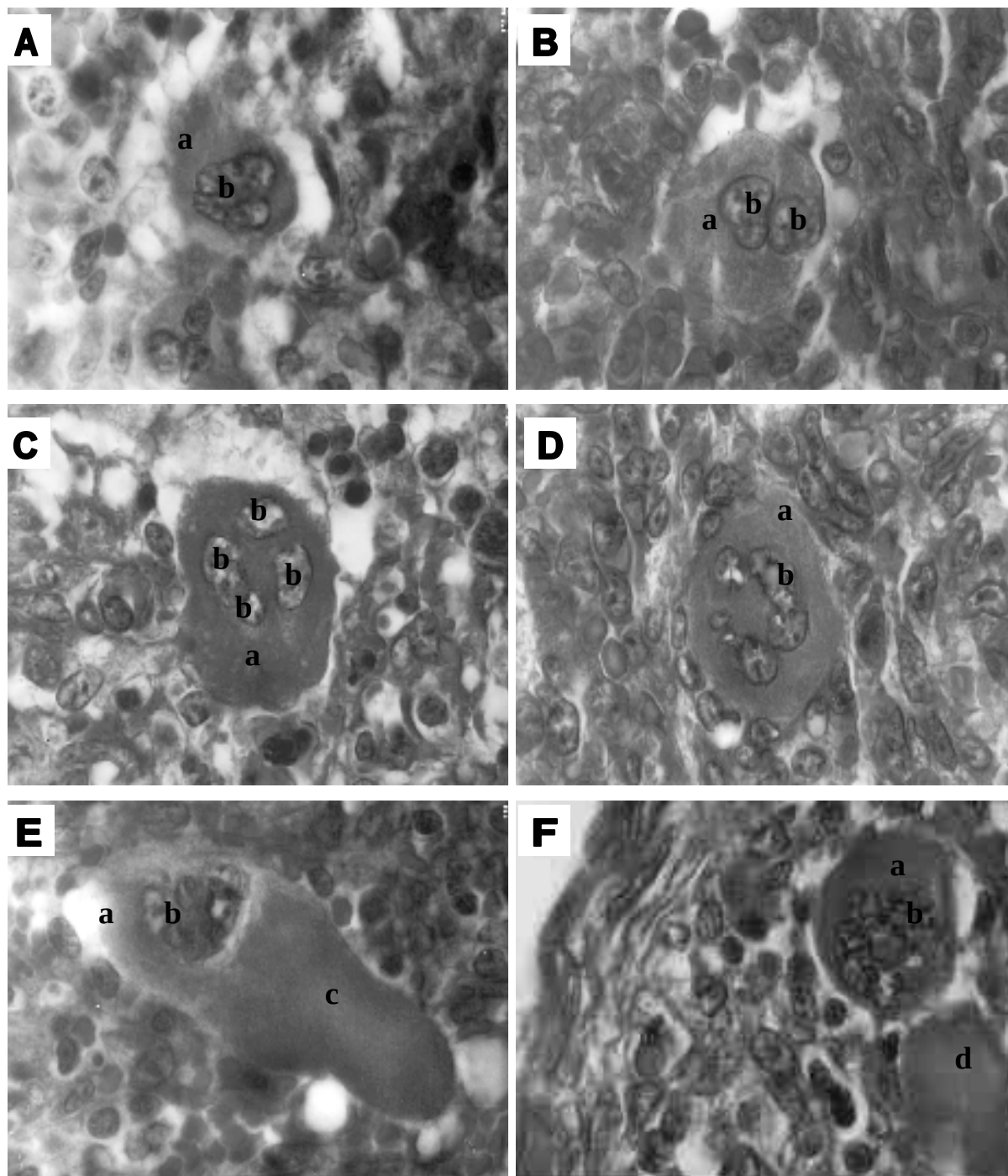


Figura 1. Fotomicrografia do baço de coelho da raça Nova Zelândia Branco, evidenciando um megacarioblasto (A) no 8º dia de vida pós-natal; um promegacariócito (B) no 12º dia de vida pós-natal; um megacariócito cariocinético (C) no 12º dia de vida pós-natal; um megacariócito maduro (D) no 28º dia de vida intra-uterina; um megacariócito maduro com processo proplaquetário (E) no 84º dia de vida pós-natal e um metamegacariócito (F) no 12º dia de vida pós-natal. a) citoplasma; b) núcleo; c) processo proplaquetário; d) proplaqueta; Tricrômico de Masson, 100x

A individualização das células megacariocíticas envolvidas na megacariocitopoiese esplênica verificada em nossos resultados concordou com as narrações de Banks (1992a), quando este afirma que, no processo da megacariocitopoiese, as células sucessivamente comprometidas foram megacarioblasto, promegacariócito, megacariócito cariocinético, megacariócito propriamente dito e metamegacariócito. Por outro lado, alguns autores não descreveram essa mesma sequência. Assim, Ebbe e Stohman (1965), ao estudarem, por radioautografia em microscopia de luz, a megacariocitopoiese da medula óssea do fêmur de ratos, classificaram-na em três estágios sucessivos de maturação. O estágio I correspondeu ao megacarioblasto, o II ao megacariócito basófilo e o III ao megacariócito granular. Paulus e Aster (1983) identificaram o megacarioblasto, também denominado megacariócito, no estágio I, designaram o promegacariócito de megacariócito no estágio II ou megacariócito basófilo e denominaram o megacariócito de estágio III, maduro, acidófilo ou granular, como sendo a última forma “gigante” da série megacariocítica, não citando o metamegacariócito. Junqueira e Carneiro (1999) mencionaram somente o megacarioblasto e o megacariócito, não relatando os outros dois tipos celulares encontrados nesta pesquisa (promegacariócito e metamegacariócito), implicados na megacariocitopoiese. Confrontando-se a afinidade tintorial do citoplasma e do núcleo, tamanho do citoplasma e do núcleo, número de núcleos, bem como as suas formas, neste estudo, com as revelações dos autores supramencionados, pôde-se evidenciar a semelhança com a narração sobre o megacarioblasto feita por Junqueira e Carneiro (1999), quando descreveram essa célula com citoplasma intensamente basófilo e menor do que o megacariócito, com núcleo grande, único, oval, não lobulado e, segundo Banks (1992a), avermelhado. Com relação às demais células envolvidas na sequência megacariocitopoietica, os resultados desta pesquisa concordam com os relatos do último autor. O promegacariócito demonstrou-se maior do que o megacarioblasto, revelou discreta basofilia citoplasmática e apresentou dois núcleos. O megacariócito cariocinético mostrou-se com volume citoplasmático grande e maior do que o promegacariócito, evidenciando citoplasma acidófilo com regiões de grânulos levemente basófilos, uniformemente distribuídos e núcleo cariocinético. O megacariócito revelou acidofilia citoplasmática com algumas regiões de discreta basofilia e caracterizou-se como uma célula grande, em

conformidade com as denominações de célula “gigante” feitas por Paulus e Aster (1983) e Junqueira e Carneiro (1999), que também constatarem núcleo com forma irregular e multilobulado nessa célula. O metamegacariócito apresentou acidofilia citoplasmática com algumas regiões de discreta basofilia, sendo a maior célula dessa série, possuindo núcleo multilobulado e podendo ser interpretado como um megacariócito com grânulos citoplasmáticos agregados e plaquetas na periferia celular.

Em relação à formação e liberação de plaquetas, as observações sobre o megacariócito propriamente dito e metamegacariócito conciliaram com as revelações de Handagama *et al.* (1986) que, ao estudarem a morfologia dos megacariócitos e formação de plaquetas na medula óssea de cães e ratos, por microscopia eletrônica de varredura, também verificaram processos proplaquetários de comprimento e espessura variáveis, originados a partir da superfície dos megacariócitos, que, após terem sido segmentados por constrições regionais ao longo de sua extensão proplaquetária, confirmaram o conceito da formação de plaquetas através da segmentação de proplaquetas, sendo que esses segmentos proplaquetários, ativamente, migraram das proximidades da superfície do megacariócito ou do metamegacariócito, segundo Banks (1992a), para os sinusóides venosos, a fim de liberar plaquetas por fragmentação. Notou-se, além disso, que o metamegacariócito apresentou-se em exocitose para formar outra proplaqueta, dando continuidade à função dessa célula, o que, lembrou os relatos de Paulus e Aster (1983), de estudos *in-vitro* por microcinematografia sobre o mecanismo da plaquetogênese, no qual provavelmente, milhares de plaquetas, foram liberados por megacariócito. Retratou também as evidências de Harker e Finch (1969) em megacariócitos da medula óssea de humanos normais, através de microscopia de contraste de fase, que a produção média diária por célula foi de 49 plaquetas.

Dessa forma, imagina-se que a diferenciação dos rins, fígado, sistema imunológico, tecido conjuntivo e pele, no estágio fetal (28º dia) contribuiu, efetivamente, na elaboração das substâncias humorais específicas, tais como interleucinas, trombopoietina e eritropoietina, as quais induziram a megacariocitopoiese, considerando os relatos de Inoue *et al.* (1993), que observaram, por microscopia eletrônica, em megacariócitos da medula óssea de ratos *in vitro* que a interleucina-6 aumentou significativamente o diâmetro dos megacariócitos. Ainda de acordo com McDonald *et al.* (1975), a

trombopoietina é produzida nos rins e, conforme Banks (1992a), a eritropoietina é sintetizada nos rins e fígado, e também de acordo com Banks (1992b), as interleucinas secretadas pelos macrófagos e linfócitos T helper, e ainda segundo Junqueira e Carneiro (1999), as interleucinas são secretadas por mastócitos, fibroblastos, estroma da medula óssea, queratinócitos e monócitos. Estas afirmações são consoantes com a literatura. Burstein *et al.* (1992), estudando os efeitos da interleucina-11 sobre os megacariócitos da medula óssea de murinos e de humanos, evidenciaram que essa citocina promove a maturação dessas células. Inoue *et al.* (1993), ao pesquisarem os megacariócitos da medula óssea de ratos *in vitro*, verificaram, por microscopia eletrônica, que a interleucina-3, interleucina-6 e eritropoietina foram capazes de estimular, embora com potencial variado, a formação de processos citoplasmáticos nessas células, estruturas intermediárias entre megacariócitos e plaquetas na seqüência do amadurecimento dessa linhagem celular. Observaram ainda que a interleucina-6 favorece a ploidia dos megacariócitos. Burstein (1994), ao investigar os efeitos da interleucina-6 sobre os megacariócitos e sobre a função plaquetária em cães, revelou que essa citocina é multifuncional, por ser um potente promotor da maturação megacariocítica, mostrando aumento de tamanho, ploidia e produção de plaquetas. An *et al.* (1994), ao estudarem, *in vitro*, os megacariócitos de camundongos, evidenciaram que a eritropoietina e interleucina-6 estimularam a formação de processos citoplasmáticos nessas células, os quais são considerados formações proplaquetárias. Tajika *et al.* (1996), ao pesquisarem a trombocitopoiese, *in vitro* e *in vivo*, por microscopia de imunofluorescência e eletrônica, de megacariócitos da medula óssea de camundongos, que receberam 10 mμg/animal/dia de interleucina-6, subcutânea, verificaram formação de feixes de microtúbulos no citoplasma, de aproximadamente metade dessas células, proporcional a um aumento na contagem de plaquetas. Concluíram que a formação de feixes de microtúbulos é um evento maturacional no desenvolvimento do megacariócito e que a interleucina-6 poderia acelerar esse evento. Zucker-Franklin e Kaushansky (1996), ao investigarem o efeito da trombopoietina sobre culturas de megacariócitos provenientes da medula óssea de camundongos, constataram, por ultraestrutura, que a trombopoietina é capaz de estimular a completa maturação dos megacariócitos, evidenciada pela formação de grânulos, demarcação de membranas e fragmentação citoplasmática em plaquetas. Tange e Miyazaki (1996), ao estudarem o

efeito sinérgico da eritropoietina, interleucina-6 e trombopoietina sobre culturas de megacariócitos isolados da medula óssea de ratos, evidenciaram, por microscópio de contraste de fase invertido e microscópio eletrônico de varredura, que um grande número de grupos de processos proplaquetários foram formados na dependência da dose dessas substâncias. Concluíram que a eritropoietina e interleucina-6 agiram sinergicamente somente em pequenas doses, no desenvolvimento dos processos proplaquetários que levaram à liberação de plaquetas no estágio final de maturação do megacariócito.

Concluiu-se, neste estudo, que a análise morfológica das células megacariocíticas, no baço de coelhos, evidenciou claramente atividade e seqüência megacariocitopoietica por todo o período de estudo, pela presença de células maduras no 28º dia de vida intra-uterina e no 84º dia do período pós-natal, o que pressupõe a subsequente produção de plaquetas. A individualização das células megacariocíticas envolvidas na megacariocitopoiese esplênica, nesta espécie, foi expressa seqüencialmente por megacarioblasto, promegacariócito, megacariócito cariocinético, megacariócito e metamegacariócito. Concluiu-se, também, que a megacariocitopoiese esplênica, em coelhos, à semelhança de outras espécies de mamíferos, foi um evento biológico que levou à produção de plaquetas, transcorrendo natural e indubitavelmente pela presença do ambiente estimulador da hemocitopoiese, ou mais especificamente, do microambiente indutor da megacariocitopoiese, assim como pela influência de substâncias humorais específicas (interleucinas, eritropoietina e trombopoietina), normalmente produzidas pelo organismo, e envolvidas na indução da megacariocitopoiese e trombocitopoiese.

Referências

- AN, E. *et al.* Interleukin-6 and erythropoietin act as direct potentiators and inducers of *in vitro* cytoplasmic process formation on purified mouse megakaryocytes. *Exp. Hematol.*, New York, v.22, n.2, p.149-156, 1994.
- BANKS, W.J. Hemocitopoiese. In: BANKS, W.J. (Ed.). *Histologia veterinária aplicada*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992a. cap. 12, p. 204-214.
- BANKS, W.J. Sistema linfático e imunidade. In: BANKS, W.J. (Ed.). *Histologia veterinária aplicada*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992b. cap. 19, p. 370-390.
- BEHMER, O.A. *et al.* Coloração do tecido conjuntivo. In: BEHMER, O.A. *et al.* (Ed.). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1976, cap. 11, p. 109-131.
- BURSTEIN, S.A. *et al.* Leukemia inhibitory factor and interleukin-11 promote maturation of murine and human

- megakaryocytes in vitro. *J. Cell. Physiol.*, Oklahoma City, v.153, n.2, p.305-312, 1992.
- BURSTEIN, S.A. Effects of interleukin-6 on megakaryocytes and on canine platelet function. *Stem Cells*, Oklahoma City, v.12, n.4, p.386-393, 1994.
- EBBE, S.; STOHLMAN, F.JR. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood*, Duluth, v.26, n.1, p.20-35, 1965.
- GENTRY, P.A.; DOWNIE, H.G. Coagulação sanguínea. In: SWENSON, M.J. (Ed.). *Dukes: fisiologia dos animais domésticos*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, cap. 3, p. 35-42.
- HANDAGAMA, P. et al. Scanning electron microscopic studies of megakaryocytes and platelet formation in the dog and rat. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v.47, n.11, p.2454-2460, 1986.
- HARKER, L.A.; FINCH, C.A. Thrombokinetis in man. *J. Clin. Invest.*, New York, v.48, p.963-974, 1969.
- INOUE, H., et al. Growth factor induced process formation of megakaryocytes derived from CFU-MK. *Br. J. Haematol.*, Gunma, v.85, n.2, p.260-269, 1993.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Hemocitopoiese. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (Ed.). *Histologia Básica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 13, p. 206-220.
- MCDONALD, T.P. et al. Thrombopoietin production by human embryonic kidney cells in culture. *J. Lab. Clin. Med.*, St. Louis, v.85, n.1, p. 59-66, 1975.
- PAULUS, J.M.; ASTER, R.H. Platelet kinetics. In: WILLIAMS, W.J. et al. (Ed.). *Hematology*. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1983, cap. 130, p.1185-1196.
- TAJIKI, K. et al. A novel aspect of the maturational step of megakaryocytes in thrombopoiesis: Bundle formation of microtubules in megakaryocytes. *Exp. Hematol.*, Tokyo, v.24, n.2, p.291-298, 1996.
- TANGE, T.; MIYASAKI, H. Sinergistic effects of erythropoietin and interleukin-6 on the *in vitro* proplatelet process formation of rat megakaryocytes. *Pathol. Int.*, Tokyo, v.46, n.12, p.968-976, 1996.
- ZUCKER-FRANKLIN, D.; KAUSHANSKY, K. Effect of thrombopoietin on the development of megakaryocytes and platelets: An ultrastructural analysis. *Blood*, New York, v.88, n.5, p.1632-1638, 1996.

Received on June 13, 2002.

Accepted on February 26, 2003.