

Estudo morfométrico da megacariocitopoese esplênica em coelhos da raça nova zelândia branco

Maria Rita Pacheco¹
Silvana Martinez Baraldi Artoni
Diogo Antonio da Silva Santos
Daniela Oliveira
Maria Helena Corrêa Varella
José Carlos Barbosa

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, FCAVJ/UNESP –
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, km 5, 14.884-900 –
Jaboticabal – SP, Brasil.

¹Autor para correspondência (rpacheco@fcav.unesp.br)

Aceito para publicação em 20/6/2001

Resumo

Estudou-se a proporção existente entre as células megacariocíticas e os demais componentes tissulares do baço, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, na fase intra-uterina e no período pós-natal. Em valores percentuais, constatou-se que as células megacariocíticas revelaram-se inferiores a todos os componentes tissulares do baço na maioria dos períodos de estudo, excetuando-se os recém-nascidos com oito dias de vida que mostraram o mesmo valor (0,4667%), para estas células e as trabéculas de tecido conjuntivo denso. Verificou-se que o mesmo valor (0,0667%) foi encontrado, para estas células, em recém-nascidos com 12 dias e em animais jovens com 56 dias.

A técnica morfométrica utilizada demonstrou que a megacariocitopoese esplênica alcançou seu ápice (0,4667%) em recém-nascidos com oito dias e seu declínio (0,0000%) em fetos com 28 dias de prenhez e em animais jovens com 84 dias.

Unitermos: morfometria, megacariocitopoese esplênica, coelhos.

Summary

We studied the ratio existing among the megakaryocytic cells and the other tissue constituents of the spleen, in White New Zealand rabbits in the intra-uterine phase and in the after-birth period. We observed that the percentage of megakaryocytic cells was lower than that of other splenic tissue constituents in the majority of the periods of study, with the exception of the 8-day-old new-borns that showed the same value (0.4667%) for these cells and the dense conjunctive tissue trabeculas. The same value (0.0667%) was also found for these cells in new-borns on the 12th day and in young animals on the 56th day. This morphometric technique also showed that splenic megakaryocytopoiesis reached its highest value (0.4667%) in new-borns on the 8th day, and its lowest value (0%) in fetuses on the 28th day of pregnancy and young animals on the 84th day.

Key words: morphometry, esplenic megakaryocytopoiesis, rabbits,.

Introdução

A pressão é mais elevada no interior da rede vascular do que nos tecidos circunjacentes e a enorme superfície da delicada membrana capilar é suscetível a lesões, mesmo em consequência de eventos de natureza fisiológica. Portanto existe a possibilidade

de perda de sangue, circunstância esta que pode ser fatal, se mais de um terço do volume sangüíneo for perdido. A hemostasia, a prevenção e o controle da hemorragia, é o resultado da ação de uma série de mecanismos que funcionam em harmonia. A resistência ao sangramento é, em primeiro lugar, consequência da integridade dos vasos sangüíneos e do turgor dos tecidos. Vasos sangüíneos lesados se contraem, retardando o fluxo sangüíneo e as plaquetas sanguíneas se agregam em pontos de lesão, para conter a hemorragia. Finalmente, o sangue se coagula no interior de vasos lesados e em ferimentos, formando tampões que impedem sangramento ulterior (Conley, 1978).

Face à importância das plaquetas na coagulação sangüínea, cuja origem se faz, segundo Banks (1992), a partir dos metamegacariócitos, por um processo de exocitose, no qual elas se destacam da superfície celular, objetivou-se neste estudo pesquisar a proporção de células da linhagem megacariocítica em relação aos demais constituintes tissulares do baço em fetos, recém-nascidos e em coelhos jovens da raça Nova Zelândia Branco.

Material e Métodos

Utilizou-se 14 coelhas da raça Nova Zelândia Branco, que foram acasaladas com machos da mesma raça. Após ser confirmada a prenhez por palpação abdominal, foram mantidas em gaiolas individuais com água e ração à vontade, durante o período experimental.

A megacariocitopoese esplênica foi estudada na fase intra-uterina e no período pós-natal. Para isto, duas coelhas foram sacrificadas por decapitação e colhido o baço de cinco fetos no 28º dia de prenhez. Em outras 12 fêmeas manteve-se a prenhez e, após o parto, o mesmo estudo foi realizado no baço dos cinco recém-nascidos com quatro, oito e 12 dias e no baço de cinco animais jovens com 28, 56 e 84 dias de idade. O baço de cada

animal foi fixado em solução de Bouin, por 24 horas, e processado para inclusão em parafina. Após a microtomia semi-seriada, a uma espessura de 5 μ m, os cortes histológicos foram corados pelas técnicas do Tricrômico de Masson, segundo Behmer et al. (1976) e observados à microscopia de luz, para sua análise morfométrica. Para a verificação da proporção existente entre as células da linhagem megacariocítica e os demais componentes tissulares do baço, contaram-se 300 pontos por animal, através da técnica morfométrica de Chalkley (1943). Os valores obtidos foram transformados em porcentagem e calculadas suas médias e erros padrão. Para a análise dos resultados percentuais dos componentes tissulares do baço, nos diversos períodos de estudo, utilizou-se a análise de variância pelo teste F e o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação das médias.

Resultados

A proporção existente entre as células da linhagem megacariocítica e os demais componentes tissulares do baço de fetos, recém-nascidos e animais jovens em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, determinada através da técnica morfométrica de Chalkley (1943), foi expressa em valores percentuais (Tabela 1 e Figura 1). Pelo teste de Tukey, observou-se que as células megacariocíticas apresentavam-se com valores médios oscilantes do 28^o dia da fase intra-uterina até o 84^o dia do período pós-natal (Tabela 1). Estas células não foram constatadas no 28^o dia da fase intra-uterina, no entanto, aumentavam com valores médios crescentes do 4^o até o 8^o dia do período pós-natal. Apresentavam-se com menor valor médio no 12^o dia, maior no 28^o dia do período pós-natal, diminuindo no 56^o dia e não sendo verificadas outra vez no 84^o dia do período pós-natal. As células da linhagem megacariocítica revelaram valores médios inferiores à polpa branca, aos cordões de Billroth, aos capilares sinusóides, às trabéculas de tecido conjuntivo denso e à cápsula de tecido conjuntivo denso,

TABELA 1: Valores médios, erros padrão, teste F; teste de Tukey e coeficiente de variação, obtidos para os componentes tissulares do baço de fetos com 28 dias, recém-nascidos com quatro, oito e 12 dias e de coelhos jovens da raça Nova Zelândia Branco com 28, 56 e 84 dias de idade.

Componentes tissulares do baço	28º dia da fase intra-uterina		4º dia do período pós-natal		8º dia do período pós-natal		12º dia do período pós-natal		28º dia do período pós-natal		56º dia do período pós-natal		84º dia do período pós-natal	
	Méd.	EP	Méd.	EP	Méd.	EP	Méd.	EP	Méd.	EP	Méd.	EP	Méd.	EP
Células da linhagem megacariocítica	0,0000 ± 0,0000 ²⁾		0,2567 ± 0,1247		0,4667 ± 0,1700		0,0667 ± 0,0667		0,3333 ± 0,2108		0,0667 ± 0,0667		0,0000 ± 0,0000	
Polpa branca	17,4667 ± 1,1953		8,8667 ± 1,1907		16,7333 ± 3,3356		15,6000 ± 0,5907		33,2000 ± 3,3209		41,9333 ± 3,2886		43,4667 ± 4,0614	
Cordões de Billoth	65,8000 ± 2,6217		74,6667 ± 0,9006		68,5333 ± 2,3252		63,9333 ± 3,0883		34,2000 ± 2,9601		25,8000 ± 1,6885		32,2667 ± 4,1370	
Capilares sinusóides	14,8000 ± 2,2793		13,8000 ± 1,7720		12,7333 ± 1,2534		18,4000 ± 3,5361		29,3333 ± 4,5399		30,3333 ± 2,4608		23,2667 ± 2,8662	
Trabéculas de tecido conjuntivo denso	0,0667 ± 0,0667		0,7333 ± 0,3055		0,4667 ± 0,2494		0,6667 ± 0,2789		1,2000 ± 0,4784		0,8000 ± 0,3266		0,6000 ± 0,2211	
Cápsula de tecido conjuntivo denso	1,8667 ± 0,5831		1,6667 ± 0,4595		1,0667 ± 0,4137		1,3333 ± 0,3333		1,7333 ± 0,4643		1,0667 ± 0,3559		0,4000 ± 0,0667	
Teste F	284,6900*** ¹⁾		331,0900**		169,6400**		169,7000**		79,3200**		172,1100**		112,6700**	
DMS (Tukey, 5%)	5,3116		5,1771		6,8228		6,5940		7,9423		5,7999		7,4633	
CV em %	14,8600		14,2100		18,6400		17,9700		20,5500		15,4900		20,4700	

(1) A análise estatística foi realizada com os dados transformados em ARCO SENO ÖP/100

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0,01)

(2) Em cada coluna, médias seguidas de uma letra comum, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05)

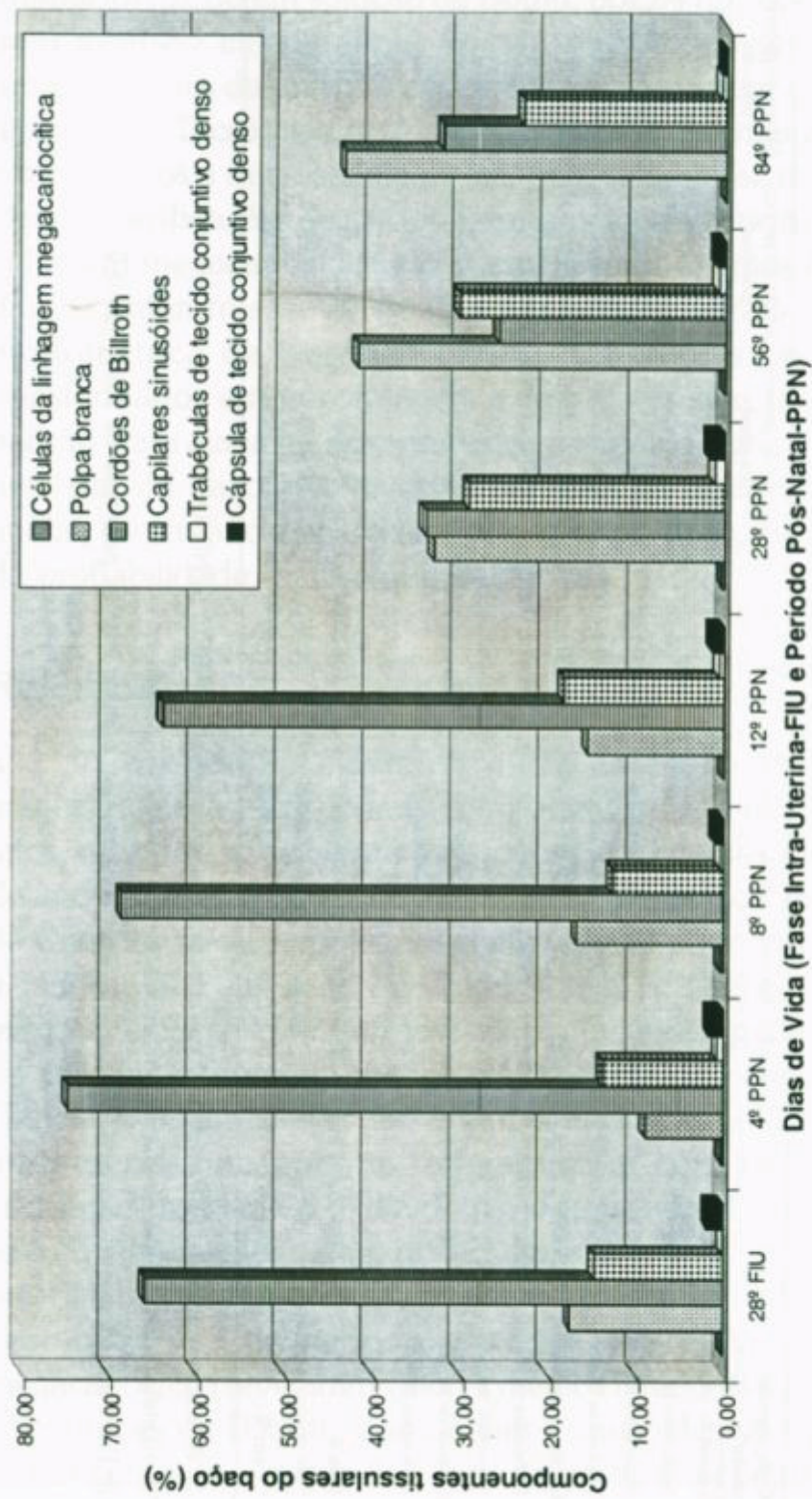


FIGURA 1: Valores percentuais médios dos componentes tissulares do baço de fetos com 28 dias, de recém nascidos com quatro, oito e 12 dias e de coelhos jovens com 28, 56 e 84 dias de idade, da raça Nova Zelândia Branco.

na maioria dos períodos de estudo. Fizeram exceção a isto os recém-nascidos com oito dias, que evidenciaram o mesmo valor médio para as células da linhagem megacariocítica e as trabéculas de tecido conjuntivo denso.

As células megacariocíticas não estavam evidenciadas em fetos com 28 dias e em animais jovens com 84 dias de idade e revelavam o mesmo valor médio em recém-nascidos com 12 dias e em animais jovens com 56 dias.

Notou-se diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os valores percentuais médios encontrados para os componentes tissulares do baço, em todos os períodos pré-estabelecidos.

A megacariocitopoese esplênica alcançou seu maior percentual em recém-nascidos com oito dias de idade e não foi evidenciável em fetos com 28 dias e em animais jovens com 84 dias.

Discussão

A época do ápice e declínio da megacariocitopoese esplênica, verificada neste experimento, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, provavelmente transcorre na fase intra-uterina, caracterizando a função do baço. Esta observação é respaldada nos relatos de Schwarze e Schröder (1970), quando afirmaram que o tecido conjuntivo embrionário do baço participa intensamente na hemocitopoese durante a segunda metade da prenhez. O fato desta técnica morfométrica de Chalkley (1943) ter evidenciado a não constatação de células megacariocíticas, em fetos no 28^a dia de prenhez, não significa que estas células inexistam neste dia. Os menores valores percentuais médios encontrados para as células da linhagem megacariocítica, em relação aos demais componentes tissulares do baço, por quase todo o período estabelecido são coincidentes com as afirmações feitas por Junqueira e Carneiro (1999), quando se referiram à hemocitopoese intra-uterina no

homem. Estes autores relataram que o baço, no período hepato-esplênico-tímico, produz principalmente células da série vermelha e, em menor quantidade, granulócitos e megacariócitos, com importante produção de linfócitos próximo ao nascimento. No período pós-natal, os resultados obtidos no presente trabalho também refletem as comunicações feitas por Junqueira e Carneiro (1999), quando mencionaram que, no período medular-linfóide ou definitivo, é intensa a eritropoese, granulocitopoese, linfocitopoese, monocitopoese e megacariocitopoese na medula óssea, o que não exclui o baço, segundo Swenson (1988), de participar, ainda que com menor potencial, destes eventos biológicos. Esta função da medula óssea na megacariocitopoese se respalda ainda nos relatos feitos por Bentfeld-Barker e Schooley (1981) que, ao investigarem os níveis de plaquetas circulantes em camundongos normais e esplenectomizados, verificaram insignificantes diferenças entre eles. Neste estudo, os mesmos valores encontrados para as células da linhagem megacariocítica e as trabéculas de tecido conjuntivo denso (0,4667%) em recém-nascidos com oito dias foram considerados casuais. A técnica morfométrica de Chalkley (1943) permitiu observar que as células da linhagem megacariocítica no baço alcançaram seus maiores valores médios (0,4667%) em recém-nascidos com oito dias, e os menores (0,0000%) em fetos com 28 dias de prenhez e em animais jovens com 84 dias. Isto nos remete aos estudos realizados por Weiss (1976), na medula óssea do fêmur de ratos; por La Pushin e Trentin (1977), no baço de camundongos; por Westen e Bainton (1979), na medula óssea do fêmur de camundongos e ratos e por Wekerle et al. (1980), no timo de camundongos. Estas pesquisas, direcionadas para o melhor entendimento do microambiente indutor da hemocitopoese, revelaram que as células de sustentação desempenham importante função na criação de um ambiente especial para o desenvolvimento de células hemocitopoéticas. Além disso, demonstraram que cada ambiente pôde ser composto de numerosos microambientes (eritrocítico, linfocítico, granulocítico

e megacariocítico). Diante destas informações, supõe-se que o microambiente indutor da megacariocitopoese esplênica, no presente estudo, manifestou-se com potencial elevado em recém-nascidos com oito dias e reduzido em fetos com 28 dias de prenhez e em animais jovens com 84 dias. A não observação de células megacariocíticas, em fetos no 28º dia de prenhez e em animais jovens no 84º dia de vida, não comprovam, em hipótese alguma, a inexistência destas células nestes dias. Salienta-se ainda que, as atuais evidências sobre o declínio da megacariocitopoese esplênica, no 28º dia de prenhez, estão de acordo com os relatos de autores que se reportaram ao fígado, como Sorenson (1960) que, ao investigar a hemocitopoese hepática em coelhos, entre o 12º e 30º dia de prenhez, através de microscopia de luz e eletrônica, também verificou a diminuição das células megacariocíticas pouco antes do nascimento. Da mesma forma, Bockman e Gulati (1989), ao pesquisarem o fígado de fetos de ratos, a partir do 11º até o 19º dia de prenhez e do 1º ao 8º dia pós-parto, usando microscopia de fluorescência, igualmente, constataram redução das células megacariocíticas ao final da prenhez. Em relação aos demais constituintes tissulares do baço, presume-se que o microambiente indutor da hemocitopoese desempenhou, com base nos resultados do presente trabalho, uma função fundamental no desenvolvimento das células que compõem a polpa branca e a polpa vermelha (cordões de Billroth e capilares sinusóides) neste órgão, já que estes constituintes evidenciaram consideráveis valores percentuais médios. Entretanto, imagina-se terem sido casuais os valores percentuais médios obtidos para as trabéculas e a cápsula de tecido conjuntivo denso, durante esta pesquisa.

Sendo assim, conclui-se que a megacariocitopoese esplênica, nesta espécie, alcançou seu ápice (0,4667%) em recém-nascidos com oito dias, e a sua ausência (0,0000%) foi verificada em fetos com 28 dias de prenhez e em animais jovens com 84 dias de vida.

Referências bibliográficas

- Banks, W.J. 1992. Hematopoese. *In*: Banks, W.J. (ed.) **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. Manole: São Paulo, p. 204-214.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas Neto, A.G. de. 1976. Coloração do tecido conjuntivo. *In*: Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas Neto, A.G. de. (eds.) **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Universidade de São Paulo, São Paulo, p.109-131.
- Bentfeld-Barker, M.E.; Schooley, J.C. 1981. Comparison of the effectiveness of bone marrow and spleen stem cells for platelet repopulation in lethally irradiated mice. **Exp. Hematol.**, **9**(2): 379-390.
- Bockman, D.E.; Gulati, A.K. 1989. Localization of fibronectin in megakaryocytes of fetal liver. **Anat. Rec.**, **223**(1): 90-94.
- Chalkley, H.W. 1943. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. **J. Nat. Cancer Inst.**, **4**: 47-53.
- Conley, C.L. 1978. Hemostasia. *In*: Mountcastle, V.B. (ed.) **Fisiologia médica**. 13. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v.2, p.1038-1047.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 1999. Hemocitopoese. *In*: Junqueira, L.C.; Carneiro, J. (eds.) **Histologia básica**. 9. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 206-220.
- La Pushin, R.W.; Trentin, J.J. 1977. Identification of distinctive stromal elements in erythroid and neutrophil granuloid spleen colonies: light and electron microscopic study. **Exp. Hematol.**, **5**: 505-522.
- Schwarze, E.; Schröder, L. 1970. **Compendio de anatomía veterinaria: embriología**. Acribia, Zaragoza, v.6, p. 247.
- Sorenson, G.D. 1960. Hepatic hematocytopoiesis in the fetal rabbit: a light and electron microscopic study. **Am. J. Anat.**, **106**: 27-40.

- Swenson, M. J. 1988. Circulação sanguínea e sistema cardiovascular. In: Swenson, M. J. (ed.) **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 13-14.
- Weiss, L. 1976. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. **Anat. Rec.**, **186**: 161-184.
- Wekerle, H.; Ketelsen, U.P.; Ernst, M. 1980. Thymic nurse cells. lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. **J. Exp. Med.**, **151**: 925-944.
- Westen, H.; Bainton, D.F. 1979. Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. **J. Exp. Med.**, **150**: 919-937.