Priscila Aparecida Ozzetti

Hematopoesse em serpentes *Oxyrhopus guibei* (Hoge & Romano, 1978) (Ophidia: Dipsadidae): Caracterização morfológica, citoquímica e ultraestrutural

Hematopoiesis in *Oxyrhopus guibei* (Hoge & Romano, 1978)
(Ophidia: Dipsadidae) snakes: Morphological, cytochemical and
ultrastructural characterization

São Paulo

2013

Priscila Aparecida Ozzetti

Hematopoesse em serpentes *Oxyrhopus guibei* (Hoge & Romano, 1978) (Ophidia: Dipsadidae): Caracterização morfológica, citoquímica e ultraestrutural

Hematopoiesis in *Oxyrhopus guibei* (Hoge & Romano, 1978)
(Ophidia: Dipsadidae) snakes: Morphological, cytochemical and
ultrastructural characterization

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Dra. Ida Sigueko Sano-Martins

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Ozzetti, Priscila Aparecida
Hematopoiesis in *Oxyrhopus guibei*
(Hoge & Romano, 1978) (Ophidia:
Dipsadidae) snakes: Morphological,
cytochemical and ultrastructural
characterization.

Número de páginas: 119

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. *Oxyrhopus guibei*
2. Maturação células sanguíneas
3. Hematopoesse

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dra. Ida Siqueiro Sano-Martins
Orientadora

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Granulopoeise em serpentes *Oxyrhopus guibei* (Ophidia: Colubridae): caracterização morfológica e citoquímica" **protocolo nº 733/10**, sob a responsabilidade de Ida Sigueko Sano-Martins e Priscila Aparecida Ozzetti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **17/06/2010**.

We certify that the research entitled "*Granulopoeise in Oxyrhopus guibei* snakes (Ophidia: Colubridae): Morphological and cytochemistry studies", **protocol nº 733/10**, under the responsibility of Ida Sigueko Sano-Martins and Priscila Aparecida Ozzetti, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 06/17/2010

Vigência do Projeto: 06/2010 – 02/2013	Nº de animais/espécie
Laboratório de Fisiopatologia	20 serpentes <i>Oxyrhopus guibei</i> + 20 ovos

São Paulo, 18 de junho de 2010.

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

À minha mãe, pelo amor, dedicação e amizade.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."

Cora Coralina

Agradecimentos

À Dra. Ida Sigueko Sano-Martins, pela orientação deste trabalho e por ter me acolhido por tanto tempo. Admiro sua dedicação e respeito à pesquisa e aos seus alunos. Obrigada pela amizade e pelos ensinamentos que levarei comigo tanto na minha vida profissional quanto pessoal.

Ao Dr. Luis Roberto C. Gonçalves, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Fisiopatologia.

A todos os pesquisadores, funcionários e alunos da Fisiopatologia, pelo apoio, incentivo e amizade ao longo desses anos de pesquisa.

À Magna Aparecida Maltauro Soares por todo o auxílio e ensinamentos em histologia.

À Lorraine Istéfane Andrade Costa por ser minha companheira de experimentos.

Ao Laboratório de Herpetologia pelo fornecimento das serpentes utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Carlos Jared, chefe do Laboratório de Biologia Celular, por disponibilizar o Microscópio Eletrônico de Transmissão multiusuário. À Dra. Cecília Mari Abe por permitir o uso do Ultramicróto (Processo Fapesp 2010/06716-0 Jovem Pesquisador) e à Simone G. S. Jared pelo auxílio e atenção.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação e a todos os docentes que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste Mestrado.

À secretária Roseli Silva Santos, sempre tão prestativa, por toda atenção e paciência.

A todos da secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Biociências pelo suporte prestado.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos os animais utilizados ao longo deste trabalho, meu profundo respeito.

À minha mãe Valquiria Lulio por sempre acreditar em mim, pelo seu amor incondicional que me fez chegar até aqui e que me faz ter forças para seguir adiante.

À minha vó Dosulina Lulio que a sempre guardarei nos momentos de carinho e amor que ultrapassam qualquer barreira da vida.

Ao meu amor Victor Gabriel que sempre esteve ao meu lado nos momentos de felicidade ou tristeza e por todas as palavras de carinho e incentivo.

Aos alunos e amigos do laboratório Carolzinha, Luana, Tati, Karina, Sânela, Lorraine, Karla, Karine, Fernanda, Bruna, Jaque, Marcio, Odair, Rodrigo, André, Carol, Thi, Andressa, Bianca e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e nos momentos de descontração.

Lista de abreviaturas

AT: Azul de toluidina

BP: Benzidina peroxidase

E: Eritrócito

Eb: Eritroblasto basófilo

Ep: Eritroblasto policromático

FA: Fosfatase ácida

H: Heterófilo

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

O. guibei : *Oxyrhopus guibei*

PAS: Ácido periodic de Schiff

Pe: Proeritrócito

Pm: Promielócito

Pr: Proeritrócito

SBB: Sudan Black B

Lista de figuras

Figura 1. Serpente *Oxyrhopus guibei*.

Figura 2. Células sanguíneas de *O. guibei* coradas com corante Rosenfeld.

Figura 3. Montagem das diferentes fases de maturação das células sanguíneas da serpente *O. guibei*.

Figura 4. Cortes histológicos de vértebras da serpente *O. guibei* jovem.

Figura 5. *Imprint* de medula óssea de vértebras de *O. guibei* corados com Rosenfeld.

Figura 6. Reações citoquímicas em células sanguíneas e corte histológico da medula óssea da vértebra da serpente *O. guibei*.

Figura 7. Reações citoquímicas em células sanguíneas de *O. guibei* e em corte histológico de vértebra.

Figura 8. Reações citoquímicas em células sanguíneas de *O. guibei*.

Figura 9. Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*.

Figura 10. Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*.

Figura 11. Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico de *O. guibei*.

Figura 12. Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*.

Figura 13. Fotos de microscopia eletrônica de transmissão de medula de *O. guibei*.

Figura 14. Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico de *O. guibei*.

Figura 15. Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*.

Figura 16. Eletromicrografia de medula óssea de *O. guibei*.

Figura 17. Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico *O. guibei*.

Figura 18. Eletromicrografia de mononuclear azurófilo maduro (a) presente no sangue periférico de *O. guibei*.

Figura 19. Eletromicrografia de medula óssea de *O. guibei*.

Figura 20. Eletromicrografia de enriquecido trombocitário de sangue periférico de *O. guibei*.

Figura 21. Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico de *O. guibei*.

Índice

I. Introdução	2
1.1 Células sanguíneas em mamíferos	2
1.1.1 Eritrócitos (hemácias)	2
1.1.2 Leucócitos	3
1.1.2.1 Neutrófilos	4
1.1.2.2 Eosinófilos	5
1.1.2.3 Basófilos	5
1.1.2.4 Monócitos	6
1.1.2.5 Linfócitos	7
1.1.3 Plaquetas	8
1.2 Hematologia de serpentes	9
1.2.1. Eritrócitos	10
1.2.2 Leucócitos	11
1.2.2.1 Linfócitos	11
1.2.2.2 Mononucleares azurófilos	11
1.2.2.3 Heterófilos	11
1.2.2.4 Eosinófilos	12
1.2.2.5 Basófilos	12
1.2.3 Trombócitos	12
1.3 Hematopoese	13
1.4 Hematopoese em serpentes	15
1.5 Serpentes	16
1.5.1 <i>Oxyrhopus guibei</i>	17
II. Objetivos	20
III. Material e métodos	22
3.1 Material	22
3.1.1 Serpentes	22
3.2 Métodos	22
3.2.1 Coleta do material	22
3.2.1.1 Processamento do material histológico	22
3.2.2 Análise morfológica das células sanguíneas	23
3.2.3 Colorações citoquímicas	23
3.2.3.1 Ácido Periódico de Schiff	24
3.2.3.2 Azul de toluidina	24
3.2.3.3 Fosfatase ácida	24
3.2.3.4 Peroxidase	25
3.2.3.5 Sudan Black B	25
3.2.3.6 Contagem de proeritrócitos	25
3.2.4 Registro Fotográfico	26

3.2.5 Análise ultraestrutural das células da medula óssea _____	26
IV. Resultados _____	28
4.1 Análise histológica da medula óssea da vértebra de <i>Oxyrhopus guibei</i> _	28
4.2 Análise morfológica e citoquímica das células hematopoéticas _____	28
4.2.1 Hematopoese _____	29
4.2.1.1 Eritropoese _____	29
4.2.1.2 Granulocitopoese _____	30
4.2.1.3 Linfopoese _____	33
4.2.1.4 Monocitopoese _____	34
4.2.1.5 Trombocitopoese _____	35
V. Discussão _____	79
VI Resumo dos Resultados _____	91
VII. Conclusões _____	93
VIII. Resumo _____	95
IX. Abstract _____	97
X. Referências Bibliográficas _____	99
XI. Biografia _____	107

Introdução

I. Introdução

O sangue é um tecido conjuntivo líquido, contido num compartimento fechado, chamado de aparelho circulatório, que mantém em movimento regular e unidirecional, devido essencialmente às contrações rítmicas do coração (Junqueira *et al.*, 2004).

O plasma e as células sanguíneas conferem ao sangue uma ampla variedade de funções fisiológicas. Além da participação na respiração (trocas gasosas) e na proteção contra doenças, também desempenha função na nutrição (transporta carboidratos, gorduras, proteínas), na excreção (transporta resíduos metabólicos), na regulação da temperatura corporal (transporta e distribui o calor), na manutenção do equilíbrio hídrico e no transporte de hormônios (Kardong, 2010). As proteínas do sangue são formadas no fígado, elas incluem albuminas, que são as mais abundantes do plasma; fibrinogênio e vários fatores da coagulação; e diversas globulinas (Hildebrand *et al.*, 2006).

As células sanguíneas dos humanos são classificadas em eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e plaquetas.

1.1 Células sanguíneas em mamíferos

1.1.1 Eritrócitos (hemácias)

Os eritrócitos dos mamíferos são anucleados, possuem a forma de disco bicôncavo e medem cerca de 7,5 μm de diâmetro. Essas hemácias apresentam citoesqueleto formado por uma rede de dímeros de espectrina, anquirina e actina, que permite mudar de forma e atravessar espaços capilares estreitos (Hansel *et al.*, 2007). O eritrócito possui a função de transportar o oxigênio dos pulmões para os tecidos, onde o oxigênio é liberado. Esta função é realizada pela ligação do oxigênio à hemoglobina (Hb), o principal componente citoplasmático dos eritrócitos maduros. A forma bicôncava dessas células proporciona aumento da superfície em relação ao volume, o que facilita as trocas de gases (Doig, 2002).

A hemoglobina é uma substância com massa molecular de 64.500 daltons, pigmentada e formada por uma porção que contém ferro, denominada de heme, e uma porção proteica, denominada globina. Sua principal função é promover a absorção, o transporte e a liberação do oxigênio dos tecidos (Lorenzi, 2003). A hemoglobina é o

pigmento respiratório mais conhecido e difundido. Ela está presente de forma intracelular nos eritrócitos de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, mas também em alguns invertebrados na forma dissolvida na hemolinfa (Schmidt-Nielsen, 2002).

Os eritrócitos humanos são liberados da medula óssea como reticulócitos, que são ligeiramente maiores do que os eritrócitos maduros e contêm um citoplasma cinza basofílico decorrente da presença residual de ribossomos citoplasmáticos (Hansel *et al.*, 2007). Após 120 dias, em média, as enzimas já estão em nível crítico, o rendimento dos ciclos metabólicos geradores de energia é insuficiente e o corpúsculo é digerido pelos macrófagos, principalmente no baço (Khanna-Gupta *et al.*, 2005).

1.1.2 Leucócitos

Os leucócitos, ou glóbulos brancos, incluem vários tipos celulares que se diferem morfológica e funcionalmente (Lorenzi, 2003). Eles são divididos em granulócitos (neutrófilo, eosinófilo e basófilo) e agranulócitos (linfócitos e monócitos).

Os leucócitos são células especializadas na defesa do organismo. Quando ocorre invasão de microrganismos, os leucócitos são atraídos até o local por quimiotaxia, isto é, substâncias originadas dos tecidos, do plasma sanguíneo e dos microrganismos induzem nos leucócitos uma resposta migratória, direcionando para os locais onde existe maior concentração dos agentes quimiotáticos (Hansel *et al.*, 2007). Os leucócitos migram através das paredes dos vasos capilares por diapedese e agrupam-se rapidamente nos locais de infecção. Alguns leucócitos destroem partículas estranhas engolfando-as, esse processo é chamado de fagocitose. Essas células também estão envolvidas na resposta imune (Hildebrand *et al.*, 2006).

Na medula óssea podemos observar os granulócitos em diversos estágios de maturação, durante o qual eles adquirem características morfológicas relacionadas com o conteúdo dos grânulos maduros (Khanna-Gupta *et al.*, 2005). O mieloblasto é a célula precursora dos granulócitos que pode se diferenciar em três linhagens distintas: neutrófilo, eosinófilo e basófilo.

Os outros dois tipos de células encontradas no sangue periférico, chamados de agranulócitos, são os linfócitos e os monócitos (Ganong, 1999).

São chamadas de anomalias leucocitárias as alterações de forma e de função dos leucócitos em geral. Algumas vezes pode haver pequena ou nenhuma alteração da

morfologia, mas a sua função pode estar comprometida. Quando a função leucocitária está alterada, observam-se as manifestações clínicas importantes, pois essas células tem função de defesa no organismo (Lorenzi, 2003).

1.1.2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais numerosos do sangue periférico em humanos normais. Durante a maturação dos granulócitos, ocorre transformação na condensação da cromatina e na forma do núcleo. Os neutrófilos jovens possuem o núcleo em forma de ferradura e são denominados bastonetes, à medida que a célula amadurece, o seu núcleo torna-se multilobulado, ou segmentado (Ganong, 1999). Os neutrófilos maduros circulam no sangue periférico por 3 a 12 horas e então migram para os tecidos onde podem sobreviver de 2 a 3 dias (Khanna-Gupta *et al.*, 2005).

Segundo Lichtman e cols, (2005) os neutrófilos, no ser humano adulto, estão presentes em três ambientes: na medula óssea, sangue e tecidos. A medula óssea é o local de diferenciação das células-tronco hematopoéticas progenitoras das células do sangue, inclusive dos granulócitos.

Os neutrófilos possuem dois tipos de grânulos: os primários ou azurófilos e os secundários ou específicos. Os grânulos primários aparecem precocemente na fase de mieloblastos e são maiores do que os específicos. Quando inicia a síntese dos grânulos específicos, a formação dos grânulos primários é interrompida. Durante as divisões mitóticas no processo da granulopoeise, os grânulos específicos, são distribuídos entre as células-filhas. Entretanto, a síntese de grânulos específicos continua durante a maturação e seu número aumenta, sendo o tipo predominante no neutrófilo maduro (Jamra *et al.*, 1983). Os grânulos primários contêm fosfatase ácida e outras enzimas lisossômicas, peroxidase (mieloperoxidase), proteínas básicas (catiônicas) ricas em arginina, e glicosaminoglicanas sulfatadas. Esses grânulos são considerados lisossomas especializados. Os grânulos específicos possuem fosfatase alcalina, collagenase, lactoferrina e lisozima (Junqueira *et al.*, 2004). Além disso, há granulações denominadas terciárias nos neutrófilos humanos, que correspondem àquelas que contêm gelatinases (Lorenzi, 2003).

Os neutrófilos são responsáveis pela destruição de microorganismos, em locais de infecção, por meio de fagocitose e liberação intrafagossomo de peróxido de hidrogênio e mieloperoxidase lisossômica (Hansel *et al.*, 2007). Após a fagocitose,

ocorre a morte celular do neutrófilo, pois essas células são incapazes de realizar novamente a síntese do material energético e das enzimas utilizadas (Jamra *et al.*, 1983).

1.1.2.2 Eosinófilos

Os eosinófilos possuem núcleo geralmente bilobulado, com várias granulações ovoides e acidófilas. Essas células têm função de fagocitar e destruir determinados complexos de antígenos com anticorpos, limitar e circunscrever o processo inflamatório (Junqueira *et al.*, 2004). Os eosinófilos são atraídos aos locais onde ocorre liberação de histamina, que é um agente quimiotático para esta célula, juntamente com os complexos antígeno-anticorpo, agregados de IgG e IgM, fator quimiotático da anafilaxia e fator quimiotático dependente do complemento (Jamra *et al.*, 1983).

Nos últimos estágios de maturação, após a formação de grânulos ter cessado, os eosinófilos contêm algumas organelas associadas com a síntese e armazenamento de proteínas. O retículo endoplasmático é escasso ou inexistente e o complexo de Golgi é discreto. O citoplasma dos eosinófilos maduros contém principalmente grânulos e glicogênio. A maioria dos grânulos são específicos e apresentam cristais (Charcot-Leyden) localizados centralmente (Lichtman *et al.*, 2005).

Os grânulos específicos coram bem pelos corantes ácidos, devido à avidez de suas proteínas básicas. Ao nível de microscopia eletrônica de transmissão, mostram aspecto peculiar, com uma parte interna, onde se encontra uma estrutura cristalina, o *internum*, e uma parte eletrondensa periférica, ou *externum* (Jamra *et al.*, 1983).

Os eosinófilos circulam por pouco tempo na corrente sanguínea e migram preferencialmente para o trato gastrointestinal, respiratório e/ou para a pele. Essas células participam de respostas mediadas por IgA, como distúrbios parasitários, dermatológicos e alérgicos (Hansel *et al.*, 2007).

1.1.2.3 Basófilos

Os basófilos têm um núcleo volumoso, com forma retorcida e irregular. O citoplasma é carregado de grânulos grandes e redondos, os quais muitas vezes obscurecem o núcleo. Esses grânulos são metacromáticos, coram intensamente em

púrpura nos esfregaços corados por Romanowsky (Junqueira *et al.*, 2004). No microscópio eletrônico seus grânulos apresentam elevada eletrondensidade. Do ponto de vista citoquímico, essas células possuem uma reação metacromática com corantes básicos, como o azul de toluidina (Bernard *et al.*, 1989).

Os basófilos participam de processos alérgicos e seus grânulos possuem histamina e heparina. Os basófilos contêm grânulos de histamina, sulfato de condroitina e podem sintetizar leucotrieno (Hansel *et al.*, 2007). A histamina dessas células é liberada no processo de degranulação que ocorre como uma reação a vários tipos de estímulos antigênicos ou de complexos antígenos/ anticorpo. Quando há um estímulo antigênico contínuo ou permanente, os eosinófilos atuam como inibidores da reativação dos mastócitos e dos basófilos, dificultando as degranulações posteriores, e desse modo, tendem a reduzir os efeitos inflamatórios da ativação antigênica ao nível dos tecidos (Bernard *et al.*, 1989).

Ocorre basofilia com frequência nas reações de hipersensibilidade imediata e nas síndromes mieloproliferativas crônicas (Hansel *et al.*, 2007).

1.1.2.4 Monócitos

Os monócitos são as maiores células do sangue circulante. Essas células são caracterizadas por um núcleo em forma de rim ou ferradura, sendo geralmente excêntricas e o citoplasma contém finas granulações azurófilas, os quais não dificilmente vistos no microscópio óptico de luz (Bernard *et al.*, 1989). O estudo do conteúdo enzimático desses grânulos mostra que eles são lisossomas. O citoplasma possui uma quantidade média de ribossomos, porém o retículo endoplasmático é pouco desenvolvido. Há algumas mitocôndrias alongadas e o complexo de Golgi é grande, provavelmente por estar relacionado à formação dos lisossomas, ou seja, grânulos azurófilos (Junqueira *et al.*, 2004).

Os macrófagos correspondem a monócitos que deixaram a corrente sanguínea e migraram para os tecidos, essas células são também encarregadas da defesa do organismo, através da capacidade de fagocitar qualquer corpúsculo estranho e participar nas reações imunológicas (Lorenzi, 2003). Acumulam-se em sítios de inflamação aguda em resposta a mediadores inflamatórios e também são importantes na manutenção de um estado inflamatório crônico (Hansel *et al.*, 2007). Para desempenhar suas importantes funções, os monócitos e macrófagos necessitam de

componentes químicos adequados que estão presentes no seu núcleo e citoplasma. Estas células possuem um metabolismo bastante ativo, especialmente aquelas que estão sendo solicitadas ou estimuladas por agentes externos, de natureza infecciosa ou não (Jamra *et al.*, 1983). As granulações presentes nos monócitos e macrófagos contêm enzimas para digerir material fagocitado. Nos macrófagos a composição química é muito mais complexa, existe atividade de síntese proteica no citoplasma, com aumento do conteúdo enzimático. As enzimas são do tipo hidrolítico ou oxidativo, há pouca mieloperoxidase, mas o teor de enzimas hidrolíticas costuma estar sempre aumentado, como a fosfatase ácida e esterases (Lorenzi, 2003).

Níveis elevados de monócitos, ou monocitose, ocorrem em diferentes condições: distúrbios hematológicos, como leucemia mieloide crônica ou aguda; distúrbios imunológicos e inflamatórios, com aumento de neutrófilos concomitantemente, como um mecanismo compensatório; doenças infecciosas e cânceres sólidos (Hansel *et al.*, 2007).

1.1.2.5 Linfócitos

Os linfócitos são células esféricas, com tamanho variável entre 6 e 8 µm, chamados de linfócitos pequenos, e os linfócitos maiores podem atingir até 18 µm, apresentando citoplasma abundante e núcleo condensado. O citoplasma dos linfócitos pequenos é escasso e apresenta basofilia discreta; seu núcleo apresenta cromatina com grumos grosseiros e sem nucléolo visível.

Os linfócitos são as células que compõem o sistema linfóide, também chamado de sistema imune ou células imunocompetentes (Jamra *et al.*, 1983). A morfologia dessas células é a mesma para os três subtipos de linfócitos sanguíneos existentes, nomeados de linfócito T, linfócito B e *natural killer* (NK). Os linfócitos B podem se diferenciar em plasmócitos, que possuem morfologia distinta dos demais (Lichtman *et al.*, 2005). Os linfócitos T e B desempenham funções vitais nas respostas imunológicas humorais e celulares. As células T produzem uma grande diversidade de linfocinas, algumas das quais são proinflamatórias. As células B, quando estimuladas por antígeno, diferenciam-se em plasmócitos que produzem anticorpos para antígenos específicos (Hansel *et al.*, 2007). Os linfócitos e os plasmócitos são células envolvidas nas reações de reconhecimento de agentes que provêm do meio

externo, os linfócitos T agem diretamente sobre elas, os linfócitos B e plasmócitos agem por intermédio da secreção de anticorpos (Lorenzi, 2003).

Os plasmócitos são células linfocitárias especiais cujo aspecto morfológico reflete a diferenciação funcional de linfócitos B, que depois de ativadas, são células que produzem anticorpos. O tamanho médio é de 10 μm e o núcleo excêntrico tem cromatina bastante condensada. O complexo de Golgi é muito desenvolvido pelo fato de estar sempre produzindo imunoglobulinas (Jamra *et al.*, 1983).

A linfopoese ocorre nos órgãos linfóides primários, que são a medula óssea e o timo. Enquanto os linfócitos B amadurecem completamente na medula óssea, os linfócitos T migram para o timo, onde completam seu desenvolvimento. Quando os linfócitos estão na fase madura, são encontrados no sangue periférico e em grandes aglomerados nos órgãos linfóides secundários, que são representados pelos gânglios linfáticos ou linfonodos, baço, amígdalas, entre outros (Bernard *et al.*, 1989; Lorenzi, 2003).

A linfocitose, ou seja, o aumento do número normal de linfócitos no sangue periférico pode ocorrer quando há infecções agudas, infecções crônicas e doenças linfoproliferativas. A linfocitopenia, diminuição de linfócitos circulantes, ocorre nos seguintes casos: distúrbios da produção dessa célula, como em linfomas de Hodgkin; quando há aumento da destruição de linfócitos, como em radiação, quimioterapia, AIDS, entre outros; e na perda de linfócitos, como em lesões linfáticas no trato gastrointestinal (Hansel *et al.*, 2007).

1.1.3 Plaquetas

As plaquetas são partículas citoplasmáticas de 2 a 4 μm , que têm função importante no mecanismo hemostático. São produzidas a partir de megacariócitos da medula óssea, uma célula poliplóide com 8 a 32 núcleos ou mais, como resultado da divisão de núcleos sem divisão de células (Colman *et al.*, 2006). As plaquetas formam-se pela fragmentação da membrana dos megacariócitos que pode dar origem a 1000 a 3000 plaquetas. O resíduo nuclear é fagocitado e eliminado pelos macrófagos da medula (Lichtman *et al.*, 2005).

As plaquetas são pequenas, anucleadas e com forma discóide. Esse formato se mantém através de um anel de microtúbulos denominado citoesqueleto que sustenta a

membrana. Possui um sistema produtor de energia pela presença de mitocôndrias e grânulos de glicogênio (Vermylen *et al.*, 1982).

Os alfa-grânulos expressam a molécula de adesão P-selectina em suas membranas e contêm fibrinogênio, fibronectina, fatores V e VIII, fator plaquetário 4 (uma quimiocina unida à heparina), fator de crescimento plaquetário e fator- β de transformação do crescimento. Há também os corpos densos ou grânulos γ que contêm ADP, ATP, cálcio ionizado, histamina, serotonina e epinefrina (Mitchell, 2005). Os alfa-grânulos e os grânulos densos são diferencialmente liberados e possuem papel crucial na resposta plaquetária secundária. Estudos recentes sugerem a existência de subclasses de alfa-grânulos (Pannerden *et al.*, 2010).

A área de superfície de plaquetas é efetivamente aumentada pela existência de dois sistemas de redes em todo o interior da membrana plaquetária: o sistema canalicular aberto e o sistema tubular denso (Meseguer *et al.*, 2002). O sistema canalicular aberto fornece uma importante via para a liberação do conteúdo dos grânulos para o exterior através das múltiplas conexões com superfície celular. Na maioria das circunstâncias, os grânulos das plaquetas parecem se mover para o centro das plaquetas na ativação plaquetária e não para a periferia. O sistema tubular denso é uma rede de canal fechado de retículo endoplasmático residual, caracterizado histologicamente pela presença de atividade peroxidase (Lichtman *et al.*, 2005).

1.2 Hematologia de serpentes

Os trabalhos que determinam o padrão hematológico dos répteis são escassos, principalmente da SubOrdem Ophidia. Os estudos hematológicos de serpentes estão concentrados mais em animais peçonhentos (Grego *et al.*, 2006; Otis, 1973; Salakij *et al.*, 2002a) do que em não peçonhentas (Roskopf *et al.*, 1982; Wojtszek, 1991), provavelmente pela sua importância médica, pois as serpentes peçonhentas são mantidas em cativeiro para extração dos venenos para produção de antivenenos.

Os trabalhos relacionados às serpentes da família Dipsadidae, antiga família Colubridae, são escassos, mas de grande importância para estabelecer um material comparativo da morfofisiologia das serpentes não peçonhentas com as peçonhentas.

As células sanguíneas encontradas no sangue periférico das serpentes são também classificadas em eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Nos vertebrados não mamíferos, os eritrócitos ou glóbulos vermelhos são nucleados e em forma oval,

assim como os trombócitos que também são nucleados e possuem função similar das plaquetas dos mamíferos (Claver *et al.*, 2009).

As células da série eritrocítica e também da trombocítica maduras das diversas espécies de animais da Classe Reptilia apresentam características morfofisiológicas muito semelhantes, porém, os leucócitos, principalmente os granulócitos, têm apresentado muitas variações entre diferentes espécies. Diversos estudos de morfologia de células sanguíneas de répteis (Alleman *et al.*, 1992; Harr *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 1999; Sacchi *et al.*, 2007; Work *et al.*, 1998) e especialmente em serpentes têm sido publicados (Alleman *et al.*, 1999; Allender *et al.*, 2006; Grego *et al.*, 2006; Otis, 1973; Salakij *et al.*, 2003; Salakij *et al.*, 2002b; Wojtszek, 1991).

Alleman (1999) classificou os diferentes tipos de leucócitos de azurófilos (monócitos), linfócitos, heterófilos e basófilos. No entanto, a variação na nomenclatura dos leucócitos utilizada por alguns autores, principalmente de heterófilos e azurófilos, tem trazido controvérsias. Por causa da similaridade funcional, alguns autores denominam os heterófilos de répteis de neutrófilos, apesar das diferenças morfológicas. Assim, os heterófilos apresentam grânulos acidófilos semelhantes aos eosinófilos, porém há variação na forma dos grânulos, que são grandes e fusiformes, e alguns arredondados. Atualmente, os diversos estudos em répteis mostram evidência de que os heterófilos e eosinófilos são linhagens distintas em alguns grupos de répteis, como quelônios e crocodilianos (Alleman *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2003; Garner *et al.*, 1996; Moura *et al.*, 1999; Ryerson, 1943; Work *et al.*, 1998), mas a existência dos eosinófilos no sangue dos Squamatas ainda é controversa (Claver *et al.*, 2009).

A seguir, veremos uma breve descrição de cada célula que compõe o sangue dos répteis:

1.2.1. Eritrócitos

Os eritrócitos possuem forma oval e pouco se diferenciam em tamanho. O núcleo é oval, centralizado e basofílico. O citoplasma é acidófilo e abundante (Otis, 1973). Os eritrócitos imaturos são células irregulares e redondas com núcleo redondo e citoplasma basofílico (Campbell, 2006). Essas células são as mais abundantes da corrente sanguínea e possuem as mesmas funções das hemácias dos mamíferos.

1.2.2 Leucócitos

1.2.2.1 Linfócitos

Os linfócitos dos répteis são muito semelhantes aos dos mamíferos, mas podem variar de forma e tamanho em um mesmo indivíduo (Canfield, 1998). Essas células são redondas, com grande núcleo basofílico e citoplasma escasso (Work *et al.*, 1998). Os linfócitos são os leucócitos mais abundantes do sangue das serpentes (Grego *et al.*, 2006; Salakij *et al.*, 2002a).

1.2.2.2 Mononucleares azurófilos

Entre os leucócitos, os mononucleares azurófilos, ou monócitos, são o segundo tipo celular mais encontrado na corrente sanguínea das serpentes (Salakij *et al.*, 2002a).

A nomenclatura do mononuclear azurófilo ainda é muito discutida. De acordo com Canfield (1998), o termo azurófilo refere-se a uma forma de monócito que contém numerosos grânulos azurofílicos em seu citoplasma e que ocorre principalmente em anfíbios e répteis, especialmente em serpentes. Alleman e cols (1992) relatam que os azurófilos são células derivadas dos monócitos, mas que contém grânulos peroxidase positivos, semelhantes às de monócitos de mamíferos. Já Salakij e cols (2002a) classificaram os azurófilos em dois subtipos de acordo com a quantidade de grânulos azurofílicos e relatou que a presença de vacúolos citoplasmáticos não foi frequente na serpente *Ophiophagus hannah*.

1.2.2.3 Heterófilos

Os heterófilos contém numerosos grânulos acidófilos com formas irregulares no seu citoplasma e possui um núcleo esférico. Heterófilos degranulados são observados em alguns casos (Alleman *et al.*, 1999). Segundo Canfield (1998), os heterófilos estão presentes em aves, répteis e peixes e tem se acreditado que os heterófilos dos répteis são análogos aos neutrófilos dos mamíferos. O seu aumento está associado a infecções bacterianas, juntamente com os monócitos.

1.2.2.4 Eosinófilos

Os eosinófilos são similares morfológicamente com os heterófilos com grânulos acidófilos, porém predominantemente redondos. O núcleo pode ser lobulado ou segmentado como em aves e mamíferos e não lobulados em peixes e alguns répteis. Eosinófilos auxiliam no combate a parasitas e reações alérgicas (Canfield, 1998).

Work e cols (1998) classificam os eosinófilos das tartarugas verdes em tamanhos grandes e pequenos. Este grupo sugere que os eosinófilos grandes representam células ativadas em degranulação ou com material coalescente granular, em resposta a uma infecção parasitária ou estímulos inflamatórios. Estudos realizados com serpentes *Ophiophagus hannah* (Salakij *et al.*, 2002a) descrevem linhagens distintas de eosinófilos e heterófilos. Os eosinófilos foram observados com uma frequência muito baixa, sendo encontrados em serpentes recém capturadas da natureza e também nas mantidas em cativeiro. Segundo esse trabalho, os eosinófilos apresentam grânulos grandes, esféricos e salientes que foram observados em duas serpentes infectadas com *Hepatozoon*. Entretanto, a presença dos eosinófilos no sangue periférico das serpentes ainda é obscura, não é referida na maioria dos trabalhos existentes.

1.2.2.5 Basófilos

Os basófilos possuem grânulos grandes, redondos e intensamente basofílicos em seu citoplasma. O núcleo tem forma arredondada e de difícil visualização pela grande quantidade de grânulos (Alleman *et al.*, 1992). Os granulócitos basofílicos estão presentes no sangue de todos os vertebrados (Canfield, 1998).

Os eosinófilos e basófilos são geralmente encontrados com menor frequência no sangue de animais saudáveis. No entanto, algumas espécies de tartarugas podem apresentar um número maior de basófilos na circulação, como a tartaruga do deserto *Gopherus agassizii* com 30% (Alleman *et al.*, 1992).

1.2.3 Trombócitos

Na análise por microscopia de luz, os trombócitos são células alongadas, com aproximadamente metade do tamanho dos eritrócitos maduros. O núcleo é oval com

cromatina densa (Salakij *et al.*, 2002b). O citoplasma é abundante, hialino e com a coloração de Giemsa não é possível visualizar granulações citoplasmáticas (Sano-Martins, 1978). Os trombócitos possuem uma grande variação na sua forma. Podem ser elípticos, quando não ativados, com parte do citoplasma deslocado para os pólos ou arredondados, quando ativados, apresentando forma irregular (Ozzetti, 2009).

Os trombócitos dos vertebrados não mamíferos são células que possuem função hemostática semelhante a das plaquetas dos mamíferos. Os trombócitos são ativos na promoção e retração do coágulo e respondem a danos na parede do vaso, agregando para formar um tampão (Belamarich *et al.*, 1966).

Além da participação na coagulação sanguínea e hemostasia, os trombócitos também são conhecidos por apresentarem atividade fagocítica. Um estudo realizado por DaMatta e cols (1998) mostrou que os trombócitos de galinha apresentaram uma baixa capacidade fagocitária, semelhante das plaquetas, relacionando uma aproximação filogenética.

1.3 Hematopoese

A hematopoese é um processo contínuo e regulado de produção de células do sangue, que inclui a renovação celular, proliferação, diferenciação e maturação. Esses processos resultam na formação, desenvolvimento e especialização de todas as células do sangue que são liberadas da medula óssea para a circulação (Smith, 2007). A hematopoese em humanos inicia-se durante o processo de formação do embrião, no saco vitelínico em uma região extraembrionária. Ao longo do desenvolvimento do embrião, a hematopoese se torna intraembrionária ocorrendo no fígado fetal, baço e na medula óssea (Lichtman *et al.*, 2005). Em neonatos e adultos, estes processos estão restritos a medula óssea, principalmente nas vértebras, no esterno e costelas (Hansel *et al.*, 2007; Smith, 2007). Os leucócitos granulócitos diferenciam-se neste local no período de 7 a 10 dias (Khanna-Gupta *et al.*, 2005).

O nicho hematopoético ou estroma medular é composto por um microambiente, no qual há o desenvolvimento das células sanguíneas através de fatores de crescimento ou fatores estimuladores de colônias. Estes fatores são responsáveis por estimular a proliferação e diferenciação das células imaturas e pela

atividade funcional das células maduras. Vários tipos celulares contribuem para o nicho, incluindo osteoblastos, células endoteliais, osteoclastos, adipócitos, células mesenquimais e as células hematopoéticas (Abdelhay *et al.*, 2009). A sinalização entre células não hematopoéticas que compõem os nichos celulares da medula óssea e as células-tronco hematopoéticas (CTH) tem papel fundamental para o desenvolvimento e manutenção do sistema hematopoético (Bakondi *et al.*, 2010). As células-tronco mesenquimais não hematopoéticas (CTM) da medula óssea são capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Essas células podem suportar uma cultura de células hematopoéticas *in vitro* através de componentes da matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento mostrando, assim, a elevada importância de todos os componentes do nicho para formar um microambiente propício para hematopoese (Gregory *et al.*, 2005).

As células sanguíneas passam por diversos estágios de diferenciação e maturação, antes de atingirem a maturação completa e passarem para a corrente sanguínea.

As plaquetas se originam da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos presentes na medula óssea. Durante o processo de maturação, essas células formam uma demarcação de sistemas de membranas que dividem o citoplasma em pequenas porções que se desprendem, formando as plaquetas que são lançadas na circulação (Lichtman *et al.*, 2005; Lorenzi, 2003).

A célula-tronco hematopoética é responsável pela formação de todas as células do sangue. A partir de estímulos ela pode se dividir e diferenciar na linhagem linfóide ou mieloide (Lorenzi, 2003). Após novo estímulo específico e divisão celular ela se torna uma célula progenitora que produz sequencialmente as células precursoras, também chamados de blastos. Nesta fase, as células apresentam características morfológicas diferenciadas para cada linhagem (Junqueira *et al.*, 2004).

Nos granulócitos, o mieloblasto passa pelos estágios de promielócito, que pode se diferenciar em mielócitos neutrófilos, eosinófilos ou basófilos dependendo do estímulo induzido. As três linhagens prosseguem a maturação apresentando seus grânulos específicos na fase de metamielócitos. A fase um pouco mais jovem dos neutrófilos segmentados são denominados de bastonetes por apresentar o núcleo em

forma de bastão, ou seja, núcleo sem lóbulos. A partir do estágio mielócito normalmente as células não se dividem mais (Khanna-Gupta *et al.*, 2005).

Normalmente, 75% das células encontradas na medula óssea dos humanos pertencem à série mielóide e somente 25% à série eritrocitária (são hemácias, em diferentes fases de maturação). Todavia, existem acima de 500 vezes mais hemácias do que leucócitos, na circulação sanguínea. Esta diferença, na medula óssea, provavelmente, reflete o fato de que a vida média dos leucócitos é curta, enquanto a das hemácias é longa (Ganong, 1999). Com o aumento da idade, a medula óssea vermelha, rica em hematopoese, é gradualmente substituída por tecido adiposo, levando ao aspecto de medula óssea amarela (Hansel *et al.*, 2007).

1.4 Hematopoese em serpentes

Em amniotas, répteis, aves e mamíferos, a formação inicial do sangue ocorre em ilhotas sanguíneas extraembrionárias do saco vitelínico. A agregação dos hemangioblastos no saco vitelínico é importante para o desenvolvimento do embrião, pois as ilhotas sanguíneas do saco vitelínico dão origem às veias que transportam nutrientes ao embrião (Baumann *et al.*, 2005). Embora o saco vitelínico, fígado fetal, baço e medula óssea sejam os locais mais comuns de hematopoese em muitos vertebrados, alguns animais desenvolveram características únicas. As células tronco hematopoéticas tem a capacidade de migrar dentro do organismo para uma região propícia para a sua existência e permitir a diferenciação das linhagens sanguíneas (Zon, 1995).

Estudos recentes mostram que nas serpentes, no início do processo de formação do embrião, a eritropoese é extraembrionária. A hematopoese intraembrionária, inicialmente é observada na região AGM (aorta gonadal mesonéfrons) e ao longo do desenvolvimento embrionário pode ocorrer no timo, baço e medula óssea (Cavillac, 2009). Em serpentes recém-nascidas (Dabrowski *et al.*, 2007) e adultas (Sano-Martins *et al.*, 2002) o principal foco hematopoético de diversas linhagens sanguíneas ocorre na medula óssea de vértebras e costelas. No entanto, não existe na literatura um estudo detalhado do processo de maturação das células hematopoéticas em serpentes. Em função da grande variação de granulócitos em répteis, uma análise morfológica baseada na coloração pancromática não é suficiente para identificar diversos tipos celulares. As técnicas de coloração

citoquímica e imunocitoquímica permitem uma melhor caracterização dos grânulos em vários estágios de maturação. Recentemente foi feito um estudo para estabelecer o quadro hematológico da serpente *Oxyrhopus guibei* para melhor caracterizar os valores totais e morfologia das células sanguíneas (Ozzetti, 2009).

Os avanços da biologia molecular e da citogenética aumentaram significativamente a capacidade de diagnóstico das alterações neoplásicas em células hematopoéticas (Quixabeira *et al.*, 2008). Entretanto, por muito tempo, a classificação das diferentes fases da maturação das células hematopoéticas foi baseada na morfologia através da coloração com corantes pancromáticos. Além disso, diagnósticos das doenças hematológicas, como leucemias, linfomas e sarcomas eram complementados por análise das reações citoquímicas e imunocitoquímicas que ainda são utilizadas principalmente para análise de expressão de genes ou proteínas. Entretanto, em relação aos conhecimentos sobre a hematopoese, principalmente de répteis, ainda são escassos requerendo ainda estudos básicos como a identificação de diferentes fases de maturação das células hematopoéticas, principalmente em serpentes.

1.5 Serpentes

Atualmente, há cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, temos representantes de 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies, cerca de 10% do total de espécies (Franco, 2003).

As serpentes, assim como os outros répteis, não possuem mecanismos internos bem desenvolvidos de produção de calor e de controle de temperatura com isso são altamente influenciados pela temperatura do ambiente. Quando conseguem manter a temperatura do corpo nos limites definidos de calor, realizam atividades como o acasalamento e a alimentação (Storer *et al.*, 2003).

As serpentes podem ser classificadas como peçonhentas e não peçonhentas. As serpentes peçonhentas produzem toxinas em glândulas especializadas e tem aparelho apropriado para inoculá-las, causando problemas sérios de envenenamento no homem e animais domésticos. No Brasil, existem duas famílias de serpentes peçonhentas, a Elapidae e Viperidae . As serpentes não peçonhentas também possuem glândulas onde produzem substâncias tóxicas, que podem ser chamadas de veneno,

mas não apresentam aparelho inoculador bem desenvolvido. As serpentes não peçonhentas representam cerca de 80% da fauna ofídica brasileira (Melgarejo, 2003).

1.5.1 *Oxyrhopus guibei*

A serpente utilizada neste estudo é a *O. guibei*, conhecida como falsa coral, é uma serpente ovípara, de hábito terrícola e atividade noturna, é encontrada no sudeste do Brasil, em clareiras e em margens de florestas (Sazima *et al.*, 1992). A alimentação é composta de roedores e lacertídeos, os quais mata por constrição. Essa serpente tem capacidade de mimetismo com a coral peçonhenta, pois há semelhança no padrão de coloração. É uma serpente dócil que raramente ataca; justificando a ausência de relatos de acidentes em seres humanos (Serapicos *et al.*, 2006). Como a maioria das serpentes, as fêmeas adultas são maiores que os machos adultos. A *O. guibei* pode reproduzir continuamente, porém muitas das fêmeas param de reproduzir em períodos secos e recomeçam em períodos chuvosos (Pizzato *et al.*, 2002).

Figura 1. Serpente *Oxyrhopus guibei* (foto gentilmente cedida por Carolina Cavlac).

Objetivos

II. Objetivos

Considerando a carência de estudos relacionados à hematologia de serpentes brasileiras e a inexistência de trabalhos detalhados do processo de maturação das células hematopoéticas na literatura, o objetivo deste trabalho foi caracterizar morfolologicamente e estabelecer as diferentes fases de maturação das linhagens de células hematopoéticas da medula óssea da serpente *O. guibei* (falsa coral) recém-nascidas e adultas.

Material e Métodos

III. Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Serpentes

Foram utilizadas serpentes filhotes de 3 dias a 5 meses após o nascimento e serpentes adultas da espécie *Oxyrhopus guibei* (n=11). As serpentes adultas eram recém-chegadas da natureza e enviadas pela população ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) sob protocolo número 733/10.

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta do material

As serpentes foram anestesiadas com tiopental sódico 30mg/kg, via subcutânea (Chudzinski *et al.*, 1990). O sangue foi coletado da aorta abdominal com seringas plásticas descartáveis. Imediatamente após a coleta do sangue, foram feitas lâminas de esfregaços sanguíneos sem anticoagulante. A medula óssea foi retirada das costelas e vértebras da serpente para preparações histológicas e realização de lâminas de *imprint*. Esta técnica consiste em segurar a vértebra com uma pinça e coloca-la em contato com uma superfície de uma lâmina de vidro.

3.2.1.1 Processamento do material histológico

As vértebras foram retiradas e fixadas em solução de Bouin (solução aquosa saturada de ácido pícrico; formol 37%; ácido acético) por 6 horas, Formol Cálcio 10% por 8 horas ou Paraformaldeído 4% e Glutaraldeído 2% por 8 horas. Essas diferentes fixações foram necessárias para cada reação citoquímica. Depois da fixação, o material foi colocado em álcool 70%, sendo necessárias trocas frequentes para remoção do fixador. As amostras fixadas em Bouin, formol cálcio e paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2% foram incluídas em historresina e/ ou parafina.

Para incluir o material em parafina foi necessário desidratar as amostras na sequência: 2 vezes em álcool 95%, 2 vezes em álcool absoluto, 2 vezes em xilol. Posteriormente, as amostras foram embebidas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes com espessura de 4 a 6 μm .

Para incluir o material em historesina, que é miscível em álcool, foi desidratado apenas em álcool e embebido em historesina + álcool, posteriormente incluído em historesina. e mantido em estufa a 37°C por 1 dia. Foram obtidos cortes com espessura de 2 a 3 μm .

Os cortes foram obtidos utilizando Micrótomo Leica RM 2155. As lâminas feitas com cortes de vértebra foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), nos cortes com parafina, Hematoxilina e Floxina (HF), nos cortes de historresina, Azul de metileno 1% (Bancroft *et al.*, 2006; Rosenfeld, 1947).

3.2.2 Análise morfológica das células sanguíneas

Os esfregaços sanguíneos foram corados com corante pancromático (Rosenfeld, 1947), uma mistura de corante Giemsa e May-Grünwald dissolvida em metanol. A análise morfológica das células sanguíneas foi feita pela observação em microscópio de luz na objetiva de 100X.

3.2.3 Colorações citoquímicas

As reações citoquímicas foram avaliadas utilizando esfregaços sanguíneos sem anticoagulante e cortes histológicos das vértebras. As diferentes colorações citoquímicas realizadas foram: Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT), Fosfatase ácida (FA), Peroxidase pelo método de Benzidina (BP) e Sudan Black B (SBB).

As células foram analisadas por microscópio óptico de luz na objetiva de 40X e 100X e classificadas entre Positivas (+), Positivas em algumas células ou fracamente positivas ($\pm$) e Negativas (-).

3.2.3.1 Ácido Periódico de Schiff

Para a reação de Ácido Periódico de Schiff (Swirsky *et al.*, 2006) foram preparadas lâminas de sangue, *imprint* e cortes histológicos de medula óssea.

Os esfregaços sanguíneos e os *imprint* foram fixados em solução Formol-Metanol (1:9) durante 5 minutos em temperatura ambiente. Depois de lavadas em água corrente, os esfregaços sanguíneos e *imprint* ficaram imersas em solução de ácido periódico 1% por 20 minutos, e os cortes histológicos por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e secas ao ar. Em seguida, foram imersas no reativo de Schiff (fuccina básica, metabissulfito de sódio anidro, ácido clorídrico, água destilada) por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As lâminas foram lavadas em água sulforosa (5 minutos) e em água corrente (5 minutos). Para finalizar, o material foi contra corado com hematoxilina por 12 minutos.

3.2.3.2 Azul de toluidina

Para reação de azul de toluidina, foi utilizado o fixador Mota modificado (acetato de chumbo, ácido acético, etanol absoluto e água destilada), no qual as lâminas com o material foram fixadas por 1 minuto em temperatura ambiente e, em seguida, lavadas em água corrente. O corante azul de toluidina 0,01% em etanol 30% foi colocado nas lâminas por 5 minutos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

3.2.3.3 Fosfatase ácida

Na reação de fosfatase ácida, modificado de Gomori, 1952 (Hayhoe *et al.*, 1994), as lâminas com o material foram imersas numa solução incubadora (tampão acetato 0,05M, β glicerofosfato de sódio, nitrato de chumbo, pH 5.0) a 37°C durante 60 minutos. Após lavagem, as lâminas foram imersas em sulfeto de amônia 2% por 2 minutos e lavadas em água destilada novamente.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina por 12 minutos.

3.2.3.4 Peroxidase

Para a reação citoquímica de peroxidase foram preparadas duas soluções. Na primeira solução foi dissolvida benzidina purificada em álcool etílico e adicionada uma pequena quantidade de solução saturada de nitroprussiato de sódio a 3,6%. As lâminas de esfregaços sanguíneos e *imprint* de medula óssea foram fixadas com esta primeira solução por 3 minutos e os cortes histológicos de medula óssea por 5 minutos. Na segunda solução foram misturados volumes iguais (1:1) da primeira solução e de uma solução de peróxido de hidrogênio 3%. Esta segunda solução foi colocada sobre as lâminas por 5 minutos, depois foram lavadas delicadamente em água corrente e secas ao ar.

Para finalizar, as lâminas foram contra-coradas com Rosenfeld por 10 minutos.

Para esta reação citoquímica, o material estava emblocado em parafina.

3.2.3.5 Sudan Black B

Para reação de Sudan Black B (Sheehan *et al.*, 1947), as lâminas contendo esfregaço sanguíneo e *imprint* de medula óssea foram fixadas com vapor de formol a 37% durante 5 minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. A seguir, foram feitas duas soluções, a primeira chamada de solução estoque que consiste no corante Sudan Black B dissolvido em etanol absoluto e a segunda chamada de solução tampão onde foi colocado fenol cristalino puro, fosfato dissódico, etanol absoluto e água destilada. Após o preparo das duas soluções, foi feita a solução de uso onde foram adicionados 60% de solução estoque em 40% de solução tampão. As lâminas foram imersas na solução de uso. Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas em etanol 70% por 5 minutos, novamente lavadas em água corrente por 2 minutos e secas ao ar em temperatura ambiente.

As lâminas foram contra-coradas em Rosenfeld por 10 minutos.

3.2.3.6 Contagem de proeritrócitos

A contagem de proeritrócitos foi realizada utilizando o corante novo azul de metileno 0,5%, de acordo com a técnica já descrita para sangue humano (Dacie *et al.*, 1991).

3.2.4 Registro Fotográfico

O registro fotográfico dos cortes histológicos e esfregaços sanguíneos foram feitos por câmera digital Leica DFC 420 acoplada ao microscópio óptico de luz Leica DMLB.

3.2.5 Análise ultraestrutural das células da medula óssea

Para estudo ultraestrutural das células hematopoéticas, foram utilizadas medulas ósseas de serpentes adultas de *O. guibei* retiradas das costelas.

O sangue foi coletado por laparotomia através da aorta, próxima a região do baço e pâncreas, com seringas plásticas descartáveis e imediatamente foi colocado no pré-fixador Glutaraldeído 0,2% em tampão Tyrode por 1 hora.

O sangue periférico pré-fixado e a medula óssea foram pós-fixados na mistura de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Tyrode por 2 horas e lavado 2 vezes com o mesmo tampão por 10 minutos.. A pós-fixação foi realizada com solução de tetróxido de ósmio 1% (OsO_4) por 1 hora a 4°C e lavado 3 vezes com solução de cloreto de sódio 0,75% por 10 minutos cada lavagem. Em seguida, o material foi imerso na solução de acetato de uranila 1% por 12 – 14 horas a 4°C e lavado 2 vezes com solução de cloreto de sódio 0,75% por 10 minutos cada. O material foi desidratado em álcool etílico 50%, 70%, 90%, 95% e 100% e óxido de propileno por 30 minutos. A pré embebição foi realizada em uma mistura de óxido de propileno e resina Epon 812 na proporção de 1:1 por 1 hora. A embebição foi feita na resina Epon 812 pura por 12 horas com agitação e temperatura ambiente. Posteriormente, as medulas ósseas foram incluídas em moldes contendo resina Epon 812 e mantidas em estufa a 60°C para polimerização por cerca de 5 dias.

Para obtenção dos cortes do material foi utilizado o ultramicrotomo Leica EM UC7. Os cortes semi-finos, com espessura de aproximadamente 0,5 μm , foram colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina e observados no microscópio de luz. Os cortes ultrafinos, com aproximadamente 70 nm de espessura, foram contrastados em citrato de chumbo, analisados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E a 80 kv.

Resultados

IV. Resultados

4.1 Análise histológica da medula óssea da vértebra de *Oxyrhopus guibei*

Através dos cortes histológicos da vértebra das serpentes jovens observou-se um importante foco hematopoético, cercados por tecido ósseo ou tecido cartilaginoso (Figura 4a, 4b).

A medula óssea vertebral possui um tecido formado por um estroma com diversos tipos celulares, como alguns adipócitos, células hematopoéticas e melanócitos. Os melanócitos, células elípticas e repletas de pigmentos (melanina) de cor preta ou marrom, foram observados nos espaços extravasculares (Figura 4g). Porém, os osteoclastos, células grandes e multinucleadas (Figura 4h), foram vistos em pequena quantidade sempre localizados na região subendosteal. Essas células estavam em contato direto com as células hematopoéticas em diferentes estágios de maturação.

O seio vertebral formado com paredes de tecido ósseo apresenta grande atividade hematopoética, com a presença de diferentes linhagens sanguíneas em maturação onde são observados focos de granulócitos em diferentes fases de maturação (Figura 4c, 4d). O granulócito heterófilo e seus precursores foram os tipos celulares predominantes na medula óssea. O granulócito basófilo foi raramente visto. Macrófagos (Figura 4c) em fagocitose e figuras de mitoses foram frequentemente observadas.

A região subendosteal e central do tecido ósseo comportam muitos sinusóides (Figura 4f), com células em diferentes estágios de maturação, principalmente da série eritrocítica. Células do sangue nos estágios finais de maturação e algumas imaturas foram visualizadas atravessando a parede do sinusóide e seguindo para a luz sinusoidal. A medula óssea de várias costelas das serpentes também apresentaram foco hematopoético similar.

4.2 Análise morfológica e citoquímica das células hematopoéticas

Na Figura 2, podemos observar a morfologia das células sanguíneas maduras encontradas em esfregaços de sangue periférico. As várias fases de maturação das

células sanguíneas da serpente *O. guibei*, baseado na sua morfologia, está representado na Figura 3, que foi organizada selecionando as células de diferentes cortes histológicos da medula óssea e sangue periférico. As reações citoquímicas auxiliaram na compreensão da composição dessas células, onde podemos observar na Tabela 1. As análises feitas no microscópio eletrônico de transmissão (MET), de cortes ultrafinos de medula óssea e enriquecido de leucócitos e trombócitos de sangue periférico da serpente *O. guibei*, foram classificadas através das características nucleares, granulares, organelas presentes, tamanho e forma da célula.

4.2.1 Hematopoese

4.2.1.1 Eritropoese

As fases da maturação da linhagem eritrocítica foram classificadas como: proeritroblastos, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, proeritrócito e eritrócito maduro.

Proeritroblastos (Figura 3, 5a, 9a): são células grandes e redondas com núcleo esférico, apresentando cromatina descondensada com um ou mais nucléolos. O citoplasma é escasso, intensamente basofílico e em algumas células pode apresentar vacúolos. Ultraestruturalmente, podemos observar mitocôndrias em grande quantidade e a presença de ribossomos livres ou agrupados (polirribossomos).

Eritroblastos basófilo (Figura 3, 5b, 9b, 10a): são células redondas que possuem um núcleo largo e esférico onde é possível observar pequenos grumos de cromatina condensada, ou seja, heterocromatina, podendo ou não apresentar nucléolos. O citoplasma é basofílico com presença de mitocôndrias e diversos ribossomos livres.

Eritroblastos policromático (Figura 3, 5b, 5c, 10b): são células redondas ou levemente elípticas com núcleo geralmente esférico. Nesta fase não há nucléolos, possui baixa relação núcleo-citoplasma; com a maturação o núcleo vai se tornando mais condensado e a proporção maior do citoplasma torna-se mais evidente. Nesta fase já existe a presença da hemoglobina citoplasmática, que na coloração de Rosenfeld vai perdendo a basofilia tornando uma coloração cinza claro ou azul claro.

A reação citoquímica de BP apresentou positividade no citoplasma dos eritroblastos policromáticos, desta forma essas células foram facilmente identificadas.

Proeritrócitos (Figura 3, 5d, 11a, 11b): são células elípticas com núcleo alongado, centralizado e cromatina condensada. O citoplasma é acidófilo semelhante ao eritrócito maduro, podendo ser levemente basofílico e com mitocôndrias dispersas. Nesta fase ainda foi possível observar diversos ribossomos ou polirribossomos livres, sendo uma característica dessa linhagem celular. As células nesta fase de maturação estão presentes no sangue periférico e através coloração pancromática não é possível diferenciar dos eritrócitos maduros. Para melhor caracterizar essa fase são utilizadas colorações específicas, como novo azul de metileno, que evidencia os retículos existentes no citoplasma diferenciando, assim, dos eritrócitos maduros. A reação citoquímica BP foi positiva nesta fase.

Eritrócitos maduro (Figura 2, 3, 5b, 5c,): são células que apresentam forma elíptica com citoplasma acidófilo e abundante de hemoglobina. O núcleo é centralizado, possui forma elíptica e apresenta cromatina condensada. O citoplasma dos eritrócitos foi positivo para BP.

Ultraestruturalmente, o citoplasma é uniformemente elétron-denso, devido ao acúmulo de hemoglobina em seu citoplasma. Foram observadas poucas organelas, sendo que raramente apresentavam polirribossomos, mitocôndrias e em alguns casos retículo endoplasmático rugoso.

4.2.1.2 Granulocitopoese

As fases da maturação da linhagem granulocítica foram classificadas como: mieloblasto, promielócito, mielócito e granulócito maduro, seguindo as características básicas adotadas na classificação dos granulócitos da medula humana.

Ultraestruturalmente, os estágios de maturação dos granulócitos foram estabelecidos de acordo com os aspectos nucleares e a presença de diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos. Esses grânulos apresentaram diferentes padrões em relação a eletron-densidade, tamanho e forma, que serão descritos a seguir:

Grânulo I (g1) – são os grânulos primários, ou azurófilos, podendo apresentar tamanho variável, mas a grande maioria são pequenos, redondos e envoltos por uma membrana. O conteúdo é homogêneo e com eletron-densidade baixa ou média. Este

grânulo foi frequentemente visto em grande quantidade nos promielócitos e localizados na região central dos mielócitos e heterófilos maduros.

Grânulo II (g2) – são grânulos redondos ou alongados, média eletrônica-densidade e de tamanhos médio a grande. O conteúdo é heterogêneo com aparência de flocos e bem diferenciado em relação aos outros grânulos. Sua presença foi evidente nos estágios de promielócitos e mielócitos, sendo que em células maduras foram raramente vistas, portanto esse grânulo pode estar relacionado a células imaturas.

Grânulo III (g3) – são grânulos redondos ou alongados, elétrons-densos e com conteúdo homogêneo. Esses grânulos foram encontrados nos mielócitos e nos basófilos maduros.

Grânulo IV (g4) – são grânulos fusiformes, ou seja, de diferentes formas e apresentam uma eletrônica-densidade variada. Este grânulo está presente nos mielócitos e heterófilos maduros.

Mieloblastos (Figura 3, 4e): são células de formato arredondado e com relação núcleo-citoplasma alta. O núcleo é redondo e grande, com cromatina frouxa, pouco condensada, contendo nucléolos. O citoplasma é basofílico e contém granulações g1, retículo endoplasmático rugoso, lisossomos e algumas mitocôndrias. O mieloblasto é a célula mais imatura identificável da série granulocítica, por coloração pancromática, e sua ocorrência é baixa nos cortes analisados. Os mieloblastos foram raramente vistos; não foi possível identifica-los a nível de ultraestrutura ainda.

Promielócitos (Figura 3, 4c, 4d, 12a): são células redondas ou ovais e com citoplasma mais abundante que o mieloblasto. Possui núcleo de contorno regular, forma redonda ou oval, cromatina frouxa com grumos e distribuição não homogênea. Podem apresentar nucléolos visíveis, principalmente na análise ultraestrutural. O citoplasma é abundante e basofílico com granulações primárias ou azurófilas, g1, assim como os mieloblastos, mas já apresentam granulações secundárias ou específicas, g2. As granulações específicas são maiores, podendo ser basófilas ou acidófilas distribuídas ao longo do citoplasma. Por meio de análise em microscópio eletrônico de transmissão, as organelas frequentemente vistas nessa fase são as mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso.

A fase de promielócito apresentou positividade para as reações citoquímicas BP, SBB, FA, AT e PAS. A BP foi positiva nos grânulos acidófilos (Figura 8b, 8d),

em forma de grumos, corando em castanho e em intensidade variada, a reação SBB apresentou positividade similar (Figura 6e, 6f). A FA foi positiva em alguns grânulos do promielócito, corando em tonalidades do dourado ao castanho, sendo que em menor quantidade em relação às reações anteriores. A AT corou grânulos basófilos metacromáticos na cor roxa ou púrpura, (Figura 7b, 7c) e a reação de PAS também foi positiva nos grânulos basofílicos (Figura 6b) produzindo uma coloração rosa intensa.

Mielócitos (Figura 3, 13a, 13b): são células redondas com baixa relação núcleo citoplasma, ou seja, citoplasma abundante. O núcleo é excêntrico, de formato redondo ou oval, com cromatina mais condensada e sem nucléolos. Nesta fase observa-se fraca basofilia citoplasmática e ocorre aumento de grânulos específicos, mas podem ser observados grânulos g1, g2 e g3. Nesta fase de maturação ocorre a definição em linhagem basófila ou heterófila/acidófila, onde se observa a predominância de um tipo de grânulo específico, basófilo ou heterófilo. O mielócito heterófilo (Figura 4d) apresentou reação positiva para BP, SBB e FA, mais intensa que na fase anterior. O mielócito basófilo teve positividade para a reação de AT (Figura 7b, 7c) e PAS (Figura 6b), semelhante à fase de promielócito.

Através da análise ultraestrutural, foi possível observar em seu citoplasma organelas como, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e em alguns casos pode ser observado nucléolo não muito visível.

Granulócitos maduros:

Na medula óssea das serpentes são encontrados granulócitos maduros em abundância e são divididos em:

Heterófilos (Figura 2e, 2f, 3, 4c, 4d, 5d): são células grandes e de forma esférica, contendo um núcleo esférico e geralmente excêntrico, pouco corado. O citoplasma é abundante em grânulos grandes e acidófilos com formas variadas, g4. O heterófilo maduro apresentou reação fortemente positiva nos grânulos acidófilos para BP (Figura 8a) e SBB (Figura 6d), enquanto que a reação de FA (Figura 7d, 7e, 7f) não foi tão intensa.

Na análise por meio do microscópio eletrônico de transmissão, foi possível observar grânulos de diferentes elétrons-densidades e formas. O núcleo é periférico e com heterocromatina. As organelas frequentemente vistas foram as mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso.

Basófilos (Figura 2e, 3, 14b): são células geralmente esféricas podendo apresentar forma elíptica. O núcleo possui forma arredondada e de difícil visualização na microscopia de luz, pois os grânulos preenchem todo o citoplasma. Possuem cromatina condensada e membrana nuclear irregular (Figura 14b). O citoplasma é repleto de grânulos esféricos, basofílicos, elétron-densos e homogêneos. Ultraestruturalmente, as organelas mais observadas foram as mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Os grânulos dos basófilos maduros foram fortemente positivos para AT (figura 7a) e PAS (figura 6a, 6c).

4.2.1.3 Linfopoeise

As fases da maturação da linhagem linfocítica foram classificadas como: linfoblasto, prolinfócito e linfócito maduro.

Linfoblastos (Figura 3): são células de formato arredondado ou ligeiramente ovaladas e com relação núcleo-citoplasma alta. A forma do núcleo é redonda e grande, ocupando grande parte da célula. Possui cromatina frouxa com um ou dois nucléolos, sendo que na análise dos cortes histológicos de vértebras os nucléolos foram mais evidentes. O citoplasma é intensamente basófilo, não apresenta granulações e pode ter prolongamentos citoplasmáticos.

Na análise ultraestrutural, os linfoblastos foram raramente vistos e apresentavam núcleo grande com presença de nucléolos.

Prolinfócitos (Figura 3, 15a): são células redondas com núcleo grande e heterocromatina, podendo ou não haver presença de nucléolos. O citoplasma basófilo, algumas vezes apresenta prolongamentos citoplasmáticos. Estas células apresentam aspecto morfológico intermediário entre o linfoblasto e o linfócito maduro. Ultraestruturalmente, as organelas comumente vistas foram ribossomos livres e mitocôndrias.

Linfócitos maduros (Figura 2c, 3, 6c): são células arredondadas com citoplasma escasso, basofílico e eletron-densidade homogênea. O núcleo é redondo e volumoso ocupando quase todo volume celular, muito semelhante aos dos humanos. A cromatina é condensada e sem presença de nucléolos. Nesta espécie não houve uma variação morfológica muito grande de linfócitos e não apresentou positividade para nenhuma das reações citoquímicas estudadas.

Ultraestruturalmente, os linfócitos possuem poucas organelas, sendo que as mais frequentes foram os ribossomos e mitocôndrias. Pseudópodes (figura 16a) foram evidentes na maioria dos linfócitos analisados.

Plasmócitos (Figura 16a) – essas células possuem formato arredondado e em algumas vezes amebóide, citoplasma abundante e repleto de retículo endoplasmático rugoso granular. Outras organelas também foram vistas, como mitocôndrias grandes e alguns grânulos primários. O núcleo possui cromatina frouxa no centro e condensada ao redor do envoltório nuclear.

Os plasmócitos foram comumente observados na medula óssea, porém não foram encontrados no sangue periférico.

4.2.1.4 Monocitopoese

As fases da maturação dos mononucleares azurófilos foram classificadas como: monoblasto, promonócito e mononuclear azurófilo/monócito.

Monoblastos (Figura 3): são células grandes de forma arredondada e com citoplasma fracamente basofílico. Os grânulos primários são raramente presentes no citoplasma. A presença de vacúolos no seu citoplasma é comum. O núcleo é redondo e possui cromatina frouxa, com nucléolo visível. Estas células apresentaram positividade para as reações citoquímicas de BP e SBB em seu citoplasma, porém a reação foi mais fraca do que as células maduras da mesma linhagem.

Promonócitos (Figura 3, 18b): são células redondas e com citoplasma abundante e fracamente basofílico. O núcleo com cromatina frouxa pode apresentar nucléolos. Essas células apresentaram positividade de forma dispersa no citoplasma, em forma de grumos e produzindo uma coloração castanha para BP (Figura 8b, 8d) e SBB (Figura 6e, 6f). A FA foi fracamente positiva, com escassos pontos em seu citoplasma de cor castanho escuro.

O promonócito possui citoplasma com mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, lisossomos e grande quantidade de grânulos primários, como podemos observar na Figura 18b.

Mononuclear azurófilo ou monócito (Figura 2d, 3, 17a, 18a): são células grandes, arredondadas, citoplasma com grânulos primários, apresentando freqüentemente vacúolos. Possui núcleo excêntrico, geralmente redondo com heterocromatina pouco

condensada. Estas células apresentam reação positiva em diferentes intensidades para FA, SBB e BP. Na reação de PAS o mononuclear azurófilo (Figura 6a, 6c) teve uma reação fracamente positiva. A reação de FA (Figura 7d) foi semelhante à fase de promonócito. A SBB (Figura 6e, 6f) foi fortemente positiva em quase todo o seu citoplasma, já a reação de BP (Figura 8a, 8b, 8c) foi positiva em grumos grosseiros e grandes em regiões específicas do citoplasma dessas células.

Em poucos casos, na microscopia óptica, é possível observar grânulos primários. Já na análise ultraestrutural, através de microscópio eletrônico de transmissão, é possível observar que o citoplasma é repleto de pequenos grânulos primários, envoltos por uma membrana e de fraca eletrondensidade, além da presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (figs 17a, 17b e 18a). Vacúolos citoplasmáticos foram vistos com menor frequência.

4.2.1.5 Trombocitopoese

As fases da maturação da linhagem trombocítica foram classificadas como: tromboblasto, protrombócito e trombócito maduro.

Trombocitoblastos (Figura 3, 19a): são células ligeiramente ovais ou redondas, com relação núcleo-citoplasma baixa e citoplasma levemente basofílico. O núcleo é redondo com cromatina descondensada e nucléolo evidente. À nível ultraestrutural podemos observar no citoplasma mitocôndrias, sistema canalicular aberto, característico dessa linhagem.e.

Protrombócitos (Figura 3, 19b): são células elípticas com núcleo redondo ou ligeiramente elíptico, centralizado e com cromatina mais condensada em relação ao trombocitoblasto. O citoplasma é abundante e levemente basofílico a hialino. Os protrombócitos foram positivos para a reação citoquímica PAS, apresentando positividade no citoplasma, em forma de grumos de cor púrpura intensa, diferenciando da linhagem linfocítica. Na análise ultraestrutural, podemos observar o sistema de canais abertos, alfa-grânulos e estrutura semelhante a sistema tubular denso, descrito nas plaquetas humanas.

Trombócitos maduros (Figura 2b, 3, 20a, 21a): Quando observados ao microscópio de luz, os trombócitos são células nucleadas, de forma elíptica, citoplasma hialino e núcleo com cromatina bastante condensada. Nos esfregaços de sangue periférico, os

trombócitos podem apresentar variação na sua forma, são elípticos, quando não ativados (Figura 2b, 8a), com parte do citoplasma deslocado para os pólos ou arredondados. Quando ativados apresentam forma irregular e podem formar agregados que são encontrados com frequência nos esfregaços de sangue. Estas células foram positivas para a reação citoquímica PAS (Figura 6a), semelhante à fase anterior.

Na análise ultraestrutural, os trombócitos (Figura 20a, 21a) possuem núcleo grande e muitas vezes chanfrado. O citoplasma contém elevado número de organelas, sendo que os alfa-grânulos foram as mais abundantes. O retículo endoplasmático liso, alguns grânulos primários (Figura 19a), complexo de golgi, sistema tubular denso e feixes de microtúbulos também foram observados.

Foram encontrados grânulos elétron-densos envoltos por uma membrana, semelhante aos corpos densos das plaquetas humanas. Em alguns trombócitos, a membrana plasmática continha pequenas saliências semelhantes a pseudópodes.

Os trombócitos da serpente *O. guibei* apresentam sistema canalicular aberto (Figura 21a, 21b) bem desenvolvido e evidente. Esse sistema é invaginação da membrana citoplasmática e em cortes apresenta como inúmeras vesículas dispersas pelo citoplasma. O sistema canalicular aberto é a característica mais evidente dos trombócitos, além da presença de alfa-grânulos e sistema tubular denso que são raramente observados. É um sistema de membrana fechado, com densidade um pouco maior.

Tabela 1. Características citoquímicas das células sanguíneas maduras da serpente *Oxyrophus guibei*, obtidas por meio de esfregaços de sangue periférico.

Tipo celular	PAS	AT	FA	BP	SBB
Eritrócito	-	-	-	+	-
Heterófilo	-	-	+	+	+
Basófilo	+	+	-	-	-
Mononuclear azurófilo	±	-	±	+	+
Linfócito	-	-	-	-	-
Trombócito	+	-	-	-	-

PAS: Ácido periódico de Schiff; AT: Azul de toluidina; FA: Fosfatase ácida; BP: Benzdina peroxidase; SBB: Sudan Black B. (+) intensa positividade, (±) reação citoquímica positiva em algumas células ou fracamente positivas, (-) negativas.

Figura 2. Células sanguíneas de *O. guibei* coradas com corante Rosenfeld. A) Proeritrócitos corado com novo azul de metileno; b) trombócitos; c) linfócito e eritrócito imaturo (seta); d) azurófilo; e) Heterófilo e basófilo (seta); f) heterófilo.

Figura 3. Montagem das diferentes fases de maturação das células sanguíneas da serpente *O. guibei*.

Figura 4. Cortes histológicos de vértebras da serpente *O. guibei* jovem. a,b) corte transversal da vértebra, com formação de tecido ósseo (TO), entre este tecido podemos visualizar o corpo da vértebra (CV), seio vertebral (SV) e as costelas (CT). No SV e CT são observados focos hematopoéticos. O tecido muscular (TM) está presente em toda a camada externa da vértebra e o tubo neural (TN) no interior da mesma; c) Tecido hematopoético com atividade granulocitopoética, presença de promielócitos (Pm), mielócitos (M) heterófilos maduros (H) e macrófagos (Ma); d) Observar diferentes estágios de maturação dos granulócitos, como promielócitos (Pm), mielócitos heterófilo (Mh) e heterófilo maduro (H); e) Presença de mieloblastos (Mb) na região endosteal; f) Sinusóides (Sn) com leucócitos e eritrócitos foram frequentemente vistos no interior do tecido hematopoéticos onde podemos encontrar vários heterófilos corados com Rosenfeld; g) os melanócitos (Me) presentes próximos aos tecidos cartilagosos e ósseos; h) Osteoclasto (Oc) na região endosteal; corados com Azul de metileno.

Figura 5. *Imprint* de medula óssea de vértebras de *O. guibei* corados com Rosenfeld. a, b) Presença de proeritroblastos (Pe) e outras formas mais maduras, como eritroblastos basófilos (Eb) e eritroblastos policromáticos (Ep) evidenciando um foco eritropoético; c) presença de eritroblastos policromáticos juntamente com eritrócitos maduros (E); d) Presença de promielócito (Pm) e heterófilos maduros (H).

Figura 6. Reações citoquímicas em células sanguíneas (a, c, d) e corte histológico medula óssea (b, e, f) da vértebra da serpente *O. guibei*. Reação de **Ácido Periódico de Schiff** contracorado com Hematoxilina: a) basófilo (B) trombócito (T) e azurófilo (A) positivos; b) Observar vários granulócitos (G) imaturos (em diferentes estágios de maturação) positivos; c) O basófilo (B) é fortemente positivo, enquanto que o azurófilo (A) fracamente positivo. Heterófilo (H) e linfócito (L) negativos em *imprint* de medula óssea. Reação de **Sudan Black B** contracorado com Rosenfeld (d, e, f): Os grânulos do heterófilos apresentam-se positivos (H) em esfregaços de sangue periférico (d); alguns mononucleares azurófilos (A) e vários granulócitos (G) imaturos positivos e outros negativos em *imprint* de medula óssea.

Figura 7. Reações citoquímicas em células sanguíneas de *O. guibei* (a, d, e) e em corte histológico de vértebra (c,f). Reação de **Azul de Toluidina** sem contracoloração: Os grânulos metacromáticos de basófilo (B) são positivos em esfregaço de sangue periférico (a); da mesma forma que grânulos de alguns granulócitos (G) imaturos também são positivos em *imprint* de medula óssea (b) e em granulócitos (G) imaturos em corte histológico de vértebra (c) mostrando que podem ser mielocitos basófilos;. Reação de **Fosfatase Ácida** contracorada com Hematoxilina: O heterófilo (H) e azurófilo (A) do sangue periférico apresentam reação fracamente positiva (d, e) e enquanto que alguns granulócitos (G) e osteócitos (seta) são bastante positivos em corte histológico de vértebra (f).

Figura 8. Reações citoquímicas em células sanguíneas de *O. guibei*. Reação de **Benzidina Peroxidase** contracorada com Rosenfeld: a) Observar os leucócitos, heterófilo (H) e azurófilo (A), com reação positiva enquanto que os trombócitos (T) são negativos em esfregaços de sangue periférico. Em *imprint* de medula óssea (b, c, d) os monucleares azurófilos (A) são positivos, os granulócitos (G) apresentam uma positividade variada (b, d) possivelmente relacionada com a maturidade da célula. Os eritroblastos imaturos apresentam uma leve coloração marrom (b, c), enquanto que os trombócitos imaturos (T) e linfoblasto (Lb) são completamente negativos.

Figura 9 – Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*. a) No centro da figura presença de proeritroblasto apresentando núcleo com cromatina pouco condensada, nucléolo (nc) visível e diversas mitocôndrias (m); no lado esquerdo da foto eritroblastos basófilos (Eb) e no canto direito superior observar a presença de uma célula da linhagem eritrocítica mais madura, provavelmente um proeritrócito (Pr), com citoplasma mais denso, presença de organelas similares as mitocôndrias, parte do sistema de complexo de Golgi, mostrando que é uma região do tecido com foco eritropoético. b) Eritroblasto basófilo com nucléolo visível e presença de heterocromatina (h) também na região perinuclear.

Figura 10 – Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*. a) Eritroblastos basófilos apresentam núcleo mais condensado em relação a fase anterior, eventualmente pode apresentar nucléolo; No canto superior e inferior podemos observar a presença de dois granulócitos (G); b) Eritroblasto policromático com núcleo de cromatina heterogênia e presença de mitocôndrias (m), ribossomos (r) e complexo de Golgi (seta) no citoplasma.

Figura 11 – Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico de *O. guibei*. a, b) Corte longitudinal de proeritrócitos com núcleo centralizado apresentando com cromatina pouco condensada. As organelas são escassas nessas células quase maduras, podem ser encontrados mitocôndrias (m) e ribossomos (r) livres. A figura a também mostra um proeritrócito, sem núcleo, com vários poliribossomos (r) no citoplasma. No canto esquerdo da foto podemos observar dois trombócitos (T).

Figura 12 – Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*. a) Promielócito encontrado na medula óssea apresentando núcleo com cromatina descondensada e nucléolo evidente. Citoplasma repleto de grânulo primários (g1), grânulos imaturos (g2) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta), b) detalhe de promielócito com presença de grânulos primários (g1) e grânulos em maturação (g2).

Figura 13 – Fotos de microscopia eletrônica de transmissão de medula de *O. guibei*. a, b) Mielócitos heterófilos, com tipo de grânulos variados em tamanho e densidade, mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta).

Figura 14 – Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico de *O. guibei*. a) Heterófilo maduro com grânulos de diferentes densidades eletrônicas, com formas e tamanhos variados e núcleo (n) excêntrico, com heterocromatina perinuclear; b) Basófilo maduro com núcleo centralizado, repleto de grânulos (g3) arredondados, com pouca variação de tamanho e forma e algumas mitocôndrias (m) no citoplasma, entre os grânulos.

Figura 15 – Eletromicrografia da medula óssea de *O. guibei*. (a) Prolinfócito apresentando núcleo (n) com heterocromatina dispersa e citoplasma abundante com presença de ribossomos livres (seta) e mitocôndrias (m); b) Linfócito maduro encontrado no enriquecido de leucocitário de sangue periférico com grande proporção núcleo/citoplasma e cromatina condensada. Muitos linfócitos apresentaram pseudópodes (cabeça de seta) em sua membrana plasmática.

Figura 16 – Eletromicrografia de medula óssea de *O. guibei*. a) Plasmócito da medula óssea com citoplasma abundante repleto de retículo endoplasmático rugoso granular, a maioria bastante dilatado (seta), mitocôndrias (m) e poucos grânulos primários (g).

Figura 17 – Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico *O. guibei*. a) Mononuclear azurófilo com núcleo redondo, cromatina pouco condensado (n) e presença de grande quantidade de grânulos azurófilos, b) Detalhe da célula com citoplasma preenchido por grânulos azurofílicos, com conteúdo pouco denso (seta), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta).

Figura 18 – Eletromicrografia de mononuclear azurófilo maduro (a) presente no sangue periférico de *O. guibei* com citoplasma preenchido por vários grânulos azurofílicos (seta), mitocôndrias (m) e sistema retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta); b) Promonócito encontrado na medula óssea com grande número de grânulos azurófilos, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso disperso no citoplasma e núcleo (n) com nucléolo visível (nc).

Figura 19 – Eletromicrografia de medula óssea de *O. guibei*. a) Observar tromboplasto encontrado na medula óssea, com citoplasma contendo mitocôndrias (m) sistema canalicular aberto (seta), grânulo primário (g) e núcleo (n) apresentando cromatina frouxa com nucléolo (nc) evidente; b) Protrombócito com núcleo (n) mais condensado principalmente na região perinuclear e ainda se observa nucléolo (nc); no citoplasma verificamos a presença do sistema canalicular aberto bem desenvolvido (seta), mitocôndrias e possível sistema tubular denso (cabeça de seta).

Figura 20 – Eletromicrografia de enriquecido trombocitário de sangue periférico de *O. guibei*. a) Proeritrócito com formato elíptico (E) rodeado por trombócitos (T) com núcleo chanfrado (n) e cromatina bastante condensada; b) Detalhe de trombócito com região com provável depósito de lipídeos (dl) no seu citoplasma e figuras de mielina (seta) que foram encontrados em alguns casos.

Figura 21 – Eletromicrografia de enriquecido leucocitário de sangue periférico de *O. guibei*. a) Trombócito maduro em corte transversal com núcleo (n) irregular e citoplasma com sistema canalicular aberto evidente (seta), presença de alfa grânulos (cabeça de seta) e mitocôndrias (m); b) Detalhe de trombócito com citoplasma repleto de vesículas que compõe o sistema canalicular aberto (seta), corpo denso (cd), feixes de microtúbulos (mt) e alfa-grânulos (cabeça de seta).

Discussão

V. Discussão

Os nossos resultados apresentam pela primeira vez, a caracterização morfológica dos diferentes estágios de maturação das células sanguíneas em uma espécie de serpentes. Esse estudo definitivamente confirma a medula óssea como principal órgão hematopoético. Os focos hematopoéticos encontrados na medula óssea da vértebra de *O. guibei* recém-nascidas e adultas foram similares aos de embriões (Cavlac, 2009), e de algumas outras espécies de Viperidae recém-nascidas (Dabrowski *et al.*, 2007) e adultas (Sano-Martins *et al.*, 2002). Cavlac (2009) localizou os focos hematopoéticos ao longo do estágio embrionário de *O. guibei* e observou que, após 45 dias de ovipostura, o embrião já possui como principal foco hematopoético a medula óssea e que assim se mantém ao longo da sua vida.

De um modo geral, os indivíduos adultos de mamíferos e aves possuem a medula óssea como principal órgão hematopoético, assim como nas serpentes. No entanto, anfíbios adultos apresentam hematopoese ativa na medula óssea e rim (Manso *et al.*, 2009) e em muitos grupos de peixes o rim tem se apresentado como principal órgão hematopoético (Esteban *et al.*, 1989; Meseguer *et al.*, 1990).

Aspectos morfológicos e ultraestruturais

Existem poucos trabalhos com descrição morfológica das fases de maturação das células sanguíneas de vertebrados não mamíferos. Há uma descrição da série eritrocítica do réptil *Caiman crocodilus yacare* (Moura *et al.*, 2005) e em peixes *Dicentrarchus labrax* L., foi feita uma análise ultraestrutural da granulopoese (Meseguer *et al.*, 1990) e da eritropoese e trombopoese (Esteban *et al.*, 1989). Embora estes estudos sejam de animais pertencentes a grupos diferentes, as características morfológicas das células sanguíneas foram semelhantes às observadas na medula óssea da serpente *O. guibei* e que também apresentou muitas das características das células imaturas do sangue humano.

As diversas fases da maturação da série eritrocítica da serpente *O. guibei* apresentaram características morfológicas, citoquímicas e ultraestruturais muito semelhantes aos de outros vertebrados. Os estágios iniciais de maturação dos eritrócitos, os proeritroblastos e eritroblastos basófilos foram semelhantes aos dos

humanos e de outros vertebrados não mamíferos (Claver *et al.*, 2009). Porém, os eritrócitos das serpentes são nucleados, portanto não ocorre a fase de extrusão do núcleo observado nos mamíferos, denominado de eritroblasto ortocromático. Os proeritrócitos foram vistos esporadicamente nos esfregaços de sangue periférico (em média 4,5%), apresentando formato arredondado ou elipsoidal, núcleo com cromatina mais frouxa e citoplasma basofílico. A maioria dos proeritrócitos, ou reticulócitos dos mamíferos, corados com corantes pancromáticos são iguais aos eritrócitos maduros, havendo necessidade de uma coloração específica como o novo azul de metileno ou azul de crezil que precipita os ribossomos, mitocôndrias e outras organelas citoplasmáticas evidenciando o seu estágio menos maduro. Proeritrócitos também foram visualizados no sangue periférico das serpentes *Ophiophagus hannah* (Salakij *et al.*, 2002a) e tartarugas *Gopherus agassizii* (Alleman *et al.*, 1992), *Agrionemys horsfield* (Knotkova *et al.*, 2002). Os valores foram similares aos nossos e maiores que os dos humanos adultos e normais (0,5-2,5%). Assim, a ontogenia da série eritrocítica tem se mantido ao longo da escala zoológica, porém, com exceção dos mamíferos que apresentam eritrócitos maduros anucleados.

Nos cortes histológicos de vértebras de *O. guibei* foram observados focos da linhagem eritropoética na medula óssea, sendo que as células mais imaturas estavam aderidas ao endotélio vascular do sinusóide, enquanto que as mais maduras apresentaram-se localizadas na luz do sinusóide. Os capilares apresentaram células maduras e, em alguns casos, células em diferenciação que provavelmente estavam sendo deslocadas para os grandes vasos do sangue periférico. Resultados semelhantes foram descritos por outras serpentes (Sano-Martins *et al.*, 2002) e em jacarés (Moura *et al.*, 2005).

A análise ultraestrutural dos eritrócitos maduros da *O. guibei* apresentaram muitas semelhanças a outros estudos já publicados com vertebrados não mamíferos. Esses eritrócitos possuem núcleo com um padrão característico de heterocromatina perinuclear e citoplasma uniformemente elétron denso, como descrito no lagarto *Gallotia simonyi* (Martinez-Silvestre *et al.*, 2005) e em peixes *Dicentrarchus labrax* L. (Esteban *et al.*, 1989). Os ribossomos e polirribossomos distribuídos no citoplasma foram uma característica da série eritrocítica em maturação. A presença de banda marginal de microtúbulos, que tem um papel importante na manutenção da forma

elipsoidal, foi relatada nos eritrócitos e nos trombócitos nucleados dos vertebrados não mamíferos (Behnke, 1970; Lee *et al.*, 2004).

Na serpente *O. guibei* foi observada uma grande quantidade de granulócitos maduros e imaturos na medula óssea. Os mieloblastos foram raramente observados e suas características morfológicas foram semelhantes aos dos humanos. Os promielócitos das serpentes apresentaram três granulações diferentes, grânulos primários, acidófilos e basófilos. Granulócitos acidófilos que originam os heterófilos foram as células mais abundantes da medula óssea, assim como também descrito por Garner e cols (1996) em tartarugas *Gopherus agassizii* e Manso e cols (2009) em rãs *Lithobates catesbeianus*. Os heterófilos estão presentes em todos os peixes, répteis e aves e tem sua equivalência nos neutrófilos dos mamíferos (Blofield *et al.*, 1992) e os heterófilos maduros apresentam forma arredondada, com núcleo excêntrico ou centralizado, citoplasma com grânulos de formas e tamanhos variados.

No trabalho com o anfíbio *Lithobates catesbeianus*, Manso e cols (2009) relataram a dificuldade de identificar as fases de maturação dos precursores dos heterófilos, mas observaram que essas células são predominantes na medula óssea.

Os granulócitos apresentaram uma diversidade de grânulos, nomeados de g1 a g4, de acordo com suas características. Os grânulos g1 ou grânulos primários foram vistos em todas as fases de maturação dos granulócitos. Os grânulos g2 apresentaram conteúdo heterogêneo com aparência de flocos e sua presença foi associada com células imaturas ou em estágio de maturação, geralmente nos promielócitos e mielócitos. Resultado semelhante foi observado em rãs *Rana esculenta* por Frank (1989) que os nomeou como grânulos imaturos. Os grânulos g3 e g4 são específicos da linhagem heterófila ou basófila.

A presença de grânulos pleomórficos, com eletron densidade variada e mieloperoxidase positiva é uma característica observada em outras espécies de répteis (Carvalho *et al.*, 2006; Salakij *et al.*, 2003). A maioria dos heterófilos das serpentes apresentaram núcleo arredondado, não lobulado, heterocromatina perinuclear (Salakij *et al.*, 2002b), entretanto em lagarto gigante *Gallotia simonyi* observou núcleo de forma lobulada e muitos grânulos heterogêneos que diferem em tamanho, forma e eletron-densidade nos cortes de MET (Martinez-Silvestre *et al.*, 2005). Alguns autores inferem uma relação filogenética baseado na presença ou não dos lóbulos, ou segmentos no núcleo dos heterófilos de répteis. Entretanto, foram observados

heterófilos com núcleo segmentado no grupo dos *Sphenodon*, o único sobrevivente da ordem *Rhynchocephalia*, considerado mais primitivos. Na ordem Squamata todas as espécies estudadas da subordem serpentes apresentaram heterófilos sem lóbulos enquanto que no grupo dos lacertília algumas espécies apresentaram lóbulos e outras não (Blofield *et al.*, 1992).

Os basófilos apresentaram citoplasma repleto de grânulos esféricos e com elétron-densidade homogênea, assim como na serpente *Ophiophagus hannah* (Salakij *et al.*, 2002a), *Crotalus adamanteus* (Alleman *et al.*, 1999), e em *Elaphe o. quadrivitatta* (Bounous *et al.*, 1996). De modo geral, os grânulos basófilos são mais homogêneos do que os heterófilos nas serpentes. Martínez-Silvestre e col (2005) verificaram que alguns grânulos basófilos do lagarto *Gallotia simonyi* eram muito elétron-densos, outros eram menos intensamente corados. O que se observa em algumas espécies de serpentes é que os basófilos podem ou não apresentar uma intensa metacromasia, dependendo da espécie. As serpentes *Bothrops jararaca* possuem basófilos com grânulos muito mais metacromáticos do que a *O. guibei*. O significado fisiológico dessas diferenças não está claro, porém, no plasma de *B. jararaca* está presente um anticoagulante tipo heparina em maior quantidade do que no da *O. guibei*. O basófilo mais metacromático, com PAS mais positivo pode, hipoteticamente ser uma fonte de glicosaminoglicanas. A nível ultraestrutural ocorre variação na eletrondensidade dos grânulos redondos.

Eosinófilos e seus precursores não foram identificados no sangue e medula óssea de *O. guibei*, mas sua existência nas serpentes ainda é muito discutida. Em *Crotalus adamanteus*, (Alleman *et al.*, 1999) não referem a presença de eosinófilos, porém menciona duas populações de heterófilos. Por outro lado, diversos estudos afirmam a presença de eosinófilos em quelônios e crocodilianos além dos heterófilos (Alleman *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 1984). Assim, no sangue circulante das serpentes ainda não foi encontrado eosinófilos típicos de mamíferos ou de anfíbios.

A série linfocítica foi vista em pequena quantidade na medula óssea e com predominância de linfócitos maduros, corroborando com os resultados encontrados em rãs *Lithobates catesbeianus*, onde o principal foco linfopoético foi no rim (Manso *et al.*, 2009), e em algumas espécies de serpentes, onde foi observado uma intensa

atividade linfopoética no baço (Sano-Martins *et al.*, 2002). Nestes trabalhos, a população linfocítica não foi muito evidente na medula óssea.

Ultraestruturalmente, os linfócitos maduros contêm citoplasma escasso com mitocôndrias e ribossomos. O núcleo é redondo com aglomerados periféricos de heterocromatina. Os estudos realizados com as serpentes *Ophiophagus hannah* (Salakij *et al.*, 2002a) e *Crotalus adamanteus* (Alleman *et al.*, 1999) corroboram com nossos resultados. Assim como neste estudo, Martinez-Silvestre e cols (2005) observaram que pseudópodes foram vistos com certa frequência nos linfócitos do lagarto *Gallotia simonyi*. As características morfológicas dessa linhagem é muito semelhante ao longo da escala zoológica, apresentando apenas algumas diferenças citoquímicas de reação com PAS. Ao contrário dos linfócitos de serpentes, os de humanos, são positivos para PAS, aumentados em casos de desordens linfoproliferativos, mostrando a importância que essa técnica já teve no diagnóstico de algumas doenças hematológicas.

No sangue de répteis, constantemente são mencionados a presença de células com características semelhantes aos monócitos humanos, porém com citoplasma com vários grânulos azurófilos, que lhe conferiu a denominação de mononuclear azurófilo. Essas células apresentam no sangue circulante variações morfológicas tintoriais, provavelmente relacionada com seu estado fisiológico. Através da análise em microscópio eletrônico de transmissão, a análise dos mononucleares azurófilos maduros foi semelhante aos estudos das serpentes *Crotalus adamanteus* (Alleman *et al.*, 1999), *Homalopsis buccata* (Salakij *et al.*, 2002b) e do lagarto *Gallotia simonyi* (Martinez-Silvestre *et al.*, 2005). Os azurófilos da serpente *Bungarus fasciatus* possuem vacúolos e alguns com conteúdo fagocítico. Embora o saco vitelínico, fígado fetal, baço e medula óssea sejam os locais mais comuns de hematopoese em muitos vertebrados, alguns animais desenvolveram características únicas. As células tronco hematopoéticas tem a capacidade de migrar dentro do organismo para um região propícia para a sua existência e permitir a diferenciação das linhagens sanguíneas (Salakij *et al.*, 2003), assim como no estudo de Carvalho e cols (2006) com o lagarto *Tupinambis merianae*. A presença de numerosos grânulos azurófilos arredondadas ou alongadas no citoplasma dessas células é observada mesmo em células da medula óssea menos maduras. Os retículos endoplasmáticos, complexo de golgi e

mitocôndrias distribuídos no citoplasma volumoso e o núcleo com cromatina pouco condensada caracteriza essa linhagem celular.

Na serpente *O. guibei*, as células da linhagem trombocítica foram difíceis de ser identificadas através dos cortes histológicos de vértebra, sendo que o método de *imprint* de medula óssea foi o mais eficiente. Manso e cols (Manso *et al.*, 2009) mostraram regiões de linhagem trombocítica localizadas próximas aos sinusóides da medula óssea e trombócitos imaturos aderidos às paredes dos vasos, entretanto os autores não os diferenciam da série eritrocítica. Os trombócitos e eritrócitos circulantes foram morfológicamente semelhantes a outras espécies de serpentes como *Bothrops leucurus* (Grego *et al.*, 2006), *Bungarus fasciatus* (Salakij *et al.*, 2003), *Ophiophagus hannah* (Salakij *et al.*, 2002a), *Crotalus adamanteus* (Alleman *et al.*, 1999) e em outros répteis como, tartarugas *Chelonia mydas* (Work *et al.*, 1998), *Gopherus agassizii* (Alleman *et al.*, 1992), *Agrionemys horsfieldi* (Knotkova *et al.*, 2002), lagartos *Gallotia simonyi* (Martinez-Silvestre *et al.*, 2005), iguanas *Iguana Iguana* (Harr *et al.*, 2001) e jacarés *Alligator mississippiensis* (Mateo *et al.*, 1984).

Os trombócitos maduros foram morfológicamente semelhantes a outros trabalhos descritos em répteis, apresentando formato elíptico ou arredondado, quando ativado, núcleo com heterocromatina perinuclear, citoplasma repleto de estruturas como mitocôndrias, grânulos densos, microtúbulos marginais e sistema canalicular aberto (Alleman *et al.*, 1999; Esteban *et al.*, 1989; Martinez-Silvestre *et al.*, 2005). Um feixe marginal de microtúbulos foi visto nas extremidades da célula. Entre as organelas citoplasmáticas observam-se mitocôndrias, retículo endoplasmático, Complexo de Golgi pouco desenvolvido próximos aos centríolos e ribossomos livres e dispersos no citoplasma (Daimon *et al.*, 1987). Numerosas vesículas e canálculos de diferentes dimensões e formas formam o sistema canalicular aberto, que aumenta a superfície da membrana da célula quatro vezes, aumentando assim a eficiência da troca metabólica celular (Daimon *et al.*, 1985). Sano-Martins e cols (1994) relataram em seu estudo com trombócitos da serpente *Waglerophis merremii* estruturas com aparência similar a alpha-grânulos e sistema tubular denso de plaquetas humanas, corroborando com os resultados da serpente *O. guibei*.

Esteban e cols (1989) observaram presença de depósitos de glicogênio no citoplasma dos trombócitos e vacúolos fagocíticos (Carvalho *et al.*, 2006). Essas estruturas são observadas em plaquetas humanas que são partículas citoplasmáticas de

megacariócitos, portanto, sem núcleo. A quantidade de grânulos alfa, grânulos densos varia entre as espécies mesmo nos mamíferos. Essa variação parece ser mais exacerbada quando se considera as diferenças entre classes de animais e isso reflete na diferença de respostas fisiológicas. Por causa da presença de grânulos alfa e do sistema de canais abertos, além dos corpos densos foi fácil determinar essa linhagem celular à nível ultraestrutural, pois os tromboplastos já apresentam essas estruturas, em menor quantidade. Adicionalmente, a pouca condensação da cromatina, com nucléolos, define seu estágio pouco maduro. Não há nenhum trabalho de trombopoese nos répteis, embora a ultraestrutura dos trombócitos seja relativamente bem conhecida o que nos deu subsídios para definir com segurança essa linhagem.

Os melanócitos encontrados nos cortes histológicos da vértebra de *O. guibei* são células elípticas e repletas de pigmentos de cor escura e também foram observados por Garner em tartarugas *Gopherus agassizii* (Garner *et al.*, 1996) e em rãs *Lithobates catesbeianus* (Manso *et al.*, 2009). A presença dessas células no nicho hematopoético ainda é desconhecida.

Aspectos citoquímicos

As reações citoquímicas utilizadas neste trabalho foram de grande importância no auxílio da análise morfológica e identificação de células sanguíneas imaturas.

Os resultados obtidos na maioria das colorações citoquímicas da *O. guibei* foram semelhantes aos outros trabalhos em células sanguíneas de répteis, como serpentes (Alleman *et al.*, 1999; Salakij *et al.*, 2002a), iguanídeos (Harr *et al.*, 2001), quelônios (Alleman *et al.*, 1992; Work *et al.*, 1998) e crocodilianos (Moura *et al.*, 1999). Na tabela 1 pode-se observar o padrão de positividade das células sanguíneas maduras da serpente *O. guibei* para cada reação citoquímica testada. As diferentes reações foram inicialmente feitas nas células maduras como forma de identificação da composição celular e, a partir disso, foram analisados os materiais de *imprint* de medula óssea e cortes histológicos de vértebra. Neste material havia grande quantidade de células imaturas, as quais possuem morfologia desconhecida na literatura da hematopoese de serpentes. Os resultados deste trabalho foram obtidos através de uma associação entre a morfologia de cada linhagem e a positividade das diferentes reações citoquímicas, já que as células imaturas seguiram o mesmo padrão.

O PAS das células sanguíneas de *O. guibei* apresentou negatividade para o leucócito heterófilo, já em estudos com o crocodiliano *Caiman crocodilus yacare* (Moura *et al.*, 1999) e o quelônio *Chelonia mydas* (Work *et al.*, 1998) mostraram reação positiva para esta mesma célula. Segundo Work e cols (1998), os eosinófilos e heterófilos da tartaruga verde também são positivos para PAS.

Alguns trabalhos mencionam certa dificuldade em distinguir os trombócitos dos linfócitos em espécies de répteis principalmente quando estão diluídos em solução para contagem direta dessas células. A coloração com PAS nos esfregaços de sangue periférico de *O. guibei* teve uma utilidade importante para a distinção dessas duas linhagens celulares, já que os trombócitos apresentaram uma forte positividade e os linfócitos foram negativos. O PAS cora em forma de grumos ou grânulos, mostrando presença de glicogênio intracelular nos trombócitos, uma vez que na presença de amilase, essa positividade desaparece nos trombócitos. Resultados semelhantes foram encontrados em serpentes *Ophiophagus hannah* (Salakij *et al.*, 2002a) e *Crotalus adamanteus* (Alleman *et al.*, 1999). Através da coloração de PAS, foi possível identificar trombócitos imaturos, sendo que eles foram encontrados em pequena quantidade na medula óssea. Os eritrócitos imaturos, principalmente na fase de policromático, apresentam morfologia semelhante aos trombócitos jovens quando corados com corante pancromático. A reação de Benzidina-Peroxidase (BP), positiva para eritrócitos nesta fase, permitiu identificar dos tromboblastos e protrombócitos que são negativos para essa reação BP e positiva para PAS.

As células sanguíneas de *O. guibei* positivas para BP foram os azurófilos e heterófilos, entretanto, no sangue de quelônios o leucócito positivo foi o eosinófilo (Alleman *et al.*, 1992; Garner *et al.*, 1996) e no de iguanídeos somente o heterófilo foi positivo (Harr *et al.*, 2001). Nas células hematopoéticas de *O. guibei* foi possível identificar heterófilos e azurófilos imaturos positivos para esta coloração. Os heterófilos apresentaram aumento de positividade com a maturação, sendo que os promielócitos continham poucos grânulos positivos e os mielócitos heterófilos e heterófilos maduros foram fortemente marcados. No entanto, o estudo de Garner e cols (Garner *et al.*, 1996) com células hematopoéticas de tartarugas do deserto *Gopherus agassizii*, o único granulócito positivo para BP foi o eosinófilo, mostrando assim características diferentes dos leucócitos dependendo da espécie. Assim, em *Cordylus* (lagartos) os azurófilos também foram negativos para BP (Pienaar, 1962),

enquanto que a maioria dos azurófilos em serpentes são positivos como foi observado no nosso material.

Os eritrócitos maduros apresentaram reação positiva para benzdina-peroxidase em seu citoplasma, auxiliando a classificação das células imaturas dessa linhagem que são muito parecidas morfológicamente com os precursores dos trombócitos, que são negativos para a mesma reação.

As células sanguíneas positivas para Sudan Black B (SBB) foram os azurófilos e heterófilos, resultado similar à reação de BP. No trabalho de Casal e Orós (2007) com a tartaruga marinha *Caretta caretta*, o SBB foi positivo nos granulócitos heterófilo e eosinófilo. No estudo das células hematopoéticas, o SBB foi positivo nos azurófilos e heterófilos imaturos, e a positividade dos heterófilos foi aumentando conforme a sua maturação.

Os mononucleares azurófilos apresentaram reação positiva em diferentes intensidades para FA, SBB e BP nas células maduras e imaturas, sendo que a FA nos azurófilos imaturos a positividade foi bem fraca e pontual. As reações citoquímicas auxiliaram na identificação dos azurófilos imaturos na medula óssea, principalmente pela BP e SBB, para diferenciar de outras células linhagens de células imaturas.

A reação de Azul de toluidina (AT) evidencia os grânulos dos basófilos, que são metacromáticos. Os basófilos foram as únicas células positivas para esta reação, mostrando uma positividade forte. Assim como visto neste estudo, outros autores afirmam que grânulos dos basófilos reagem intensamente à coloração de azul de toluidina (Alleman *et al.*, 1992; Work *et al.*, 1998). No entanto, um trabalho realizado com *Iguana iguana* não exibe positividade dos basófilos para esta coloração (Harr *et al.*, 2001) mostrando variação interespecífica na composição dos grânulos. Nas células hematopoéticas de *O. guibei*, a reação de AT marcou intensamente os grânulos basofílicos dos promielócitos, mielócitos basófilos e basófilos maduros permitindo diferenciá-los dos outros granulócitos, principalmente na fase mais imatura..

A reação de Fosfatase ácida (FA) foi pontualmente positiva nos azurófilos e intensamente positiva nos heterófilos de *O. guibei*, assim como visto por Caxton-Martins (1978) nos anfíbios *Bufo regularis* e *Rana temporaris*. No entanto os resultados de outros estudos foram bastante variados. Na serpente *Crotalus adamanteus*, a FA não apresentou positividade em nenhuma célula sanguínea

(Alleman *et al.*, 1999) enquanto que em tartarugas marinhas encontraram positividade de FA para heterófilos e eosinófilos (Casal *et al.*, 2007). Assim como visto neste estudo de células hematopoéticas, Garner e cols (1996) também observaram positividade nos azurófilos imaturos das tartarugas do deserto *Gopherus agassizii*.

Os linfócitos não apresentaram reação positiva para nenhuma reação citoquímica analisada, corroborando com o resultado de Alleman e cols (1999) na serpente *Crotalus adamanteus*. Por outro lado, outros estudos comentam que o linfócito foi positivo para FA em serpentes *Elaphe obsoleta quadrivittata* (Bounous *et al.*, 1996) e lagartos *Gallotia simonyi* (Martinez-Silvestre *et al.*, 2005). Os linfócitos T humano apresentam reação positiva localizada no citoplasma (Hayhoe *et al.*, 1994). Os nossos dados confirmam essa positividade a nível ultraestrutural, em grânulos lisossomais no citoplasma de alguns linfócitos (observação pessoal).

Os osteoblastos presentes em lacunas da matriz óssea são conhecidos por osteócitos, sendo consideradas células maduras responsáveis pela manutenção do tecido ósseo e apresentam baixa atividade metabólica. A reabsorção do osso é feita por grandes células gigantes e multinucleadas chamadas de osteoclastos (Brew *et al.*, 2003). Neste estudo, os osteócitos presentes no tecido ósseo foram fortemente positivos pela FA e os osteoclastos, que foram vistos em cortes histológicos e menos frequente em *imprint* de medula, também apresentaram positividade em seu citoplasma.

As reações citoquímicas do sangue periférico auxiliaram na caracterização das linhagens celulares e seus precursores. A associação de uma ou mais positivities pôde contribuir na classificação de estágios imaturos de determinadas linhagens. O basófilo maduro apresentou positividade intensa para PAS e AT, isso contribuiu para diferenciar mielócitos basófilos do mielócitos heterófilos. O mesmo ocorreu com os heterófilos, que foram fortemente positivos para SBB e BP e pontualmente positivos para FA, facilitando na identificação do mielócito heterófilo.

A reação de BP foi de grande utilidade para análise dos eritrócitos imaturos, sua positividade no citoplasma foi aumentando de acordo com a maturação da célula e com o aumento de hemoglobina.

O mononuclear azurófilo foi a célula que apresentou maior positividade para as reações citoquímicas testadas, sendo fortemente positivo para SBB e BP e

fracamente ou pontualmente positivo para PAS e FA. Estes dados contribuíram para análise dos precursores dessa linhagem.

A análise por Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do sangue periférico e medula óssea da serpente *O. guibei* foi de elevada importância para conhecimento a nível de organelas e estruturas intracelulares. Esses resultados complementaram a caracterização das células.

Resumo dos Resultados

VI Resumo dos Resultados

- As diferentes fases de maturação da série eritrocítica, leucocítica e trombocítica foram observadas na medula óssea das vértebras e costelas da serpente *O. guibei* jovens e adultas, mostrando que é o principal sítio hematopoético.
- A maturação da série linfocítica e os proeritroblastos e eritroblastos basófilos foram semelhantes ao longo da escala zoológica dos vertebrados, inclusive dos humanos, permitindo classificá-los com coloração pancromática.
- Os mieloblastos, promielocitos e mielócitos foram caracterizados seguindo os critérios utilizados nas células humanas, respeitando as diferenças na morfologia e na reação citoquímica dos grânulos observados em leucócitos de serpentes. Os promonócitos foram facilmente distinguidos dos outros mielócitos pela presença dos grânulos azurófilos em grande quantidade e a positividade pela BP.
- Os tromboplastos e protrombócitos foram caracterizados principalmente pela reação positiva ao PAS e presença de sistema de canais abertos, grânulos alfa e corpos densos.
- Leucócitos e trombócitos completam sua fase de maturação na medula óssea, pois são encontrados frequentemente na medula enquanto que formas imaturas não são observadas na circulação. Por outro lado, os eritroblastos policromáticos podem ser encontrados no sangue periférico e frequentemente nos sinusóides da medula óssea, evidenciando a possibilidade de finalizar a maturação na circulação.

Conclusões

VII. Conclusões

Os nossos resultados obtidos com o sangue periférico e medula óssea da serpente *O. guibei* mostram que foi possível caracterizar morfologicamente as principais fases de maturação da série eritrocítica, leucocítica e trombocítica. Este é o primeiro trabalho no qual é realizado um estudo detalhado da maturação das diferentes linhagens das células sanguíneas de uma serpente. Ressaltamos a importância da coloração pancromática, pela rapidez e baixo custo, embora as reações citoquímicas e MET tenham apresentado grande valor neste estudo para uma caracterização mais segura de alguns tipos celulares. A partir desses resultados, poderão ser realizados outros estudos, mais específicos de cada linhagem, utilizando técnicas mais específicas para melhor entender o mecanismo de maturação e também a influência do microambiente do nicho hematopoético. Além disso, possibilita quantificar e conhecer a distribuição das diferentes linhagens nos órgãos hematopoéticos.

Resumo

VIII. Resumo

Hematopoese em serpentes *Oxyrhopus guibei* (Hoge & Romano, 1978) (Ophidia: Dipsadidae): Caracterização morfológica, citoquímica e ultraestrutural.

A hematopoese nas serpentes inicia-se durante a embriogênese e através dos processos de alterações da vida fetal. A primeira atividade eritropoética é extraembrionária, a partir de células mesodérmicas do saco vitelínico e durante o desenvolvimento embrionário torna-se intraembrionário. Em serpentes recém-nascidas e adultas, o principal foco hematopoético ocorre na medula óssea. O objetivo deste estudo foi caracterizar os diferentes estágios de maturação das células sanguíneas da serpente *O. guibei*, com base em estudos de microscopia, reações citoquímicas e aspectos ultraestruturais. Fragmentos de vértebras de serpentes recém-nascidas e adultas (n=11) foram coletados para obtenção da medula óssea que foi fixada em formol cálcio ou Bouin e processadas para histologia de rotina. Cortes histológicos, *imprint* de medula óssea e esfregaços sanguíneos foram corados com Rosenfeld, hematoxilina e eosina ou azul de metileno. As reações citoquímicas realizadas foram ácido periódico de Schiff (PAS), azul de toluidina (AT), Sudan Black B (SBB), benzidina peroxidase (PA) e fosfatase ácida (FA). Para a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), a medula óssea foi fixada em paraformaldeído a 4% + glutaraldeído 2%, em tampão Tyrode, pós fixados em tetróxido de ósmio a 1% e embebidos em resina Epon 812. A maior parte das células progenitoras de células sanguíneas foram identificadas em focos hematopoiéticos ativos na medula óssea de vértebras e costelas. As linhagens azurofílicas e linfoides foram morfológicamente similares aos de outros répteis. A linhagem granulocítica foi classificada como mieloblasto, promielócito, mielócito e granulócito maduro. Mielócitos podem ser diferenciados em basófilos com grânulos grandes, redondos e eletrondensidade homogênea ou heterófilos, com grânulos de tamanhos e formas variadas na análise MET. TB e PAS foram positivos nos grânulos imaturos e maduros basófilos. Por outro lado, heterófilos e azurófilos mostraram reação fortemente positiva para lípidos de SBB e BP. FA foi encontrado nos azurófilos em várias fases de maturação. As diferentes fases de eritrócitos foram classificadas como: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, proeritrócitos e eritrócitos maduros. Os trombócitos apresentaram positividade para PAS. As características dos trombócitos maduros e imaturos foram definidas através da TEM apresentando corpos densos, grânulos alfa, microtúbulos e sistema canalicular aberto. Concluindo, a medula óssea das costelas e vértebras é um importante foco hematopoético nas serpentes *O. guibei* recém-nascidas e adultas. Os aspectos morfológicos, citoquímicos e ultraestruturais são úteis para identificar e caracterizar os diferentes estágios de maturação das células sanguíneas.

Palavras-chave: Hematopoese, células sanguíneas, medula óssea, serpentes, maturação celular.

Abstract

IX. Abstract

Hematopoiesis in *Oxyrhopus guibei* (Hoge & Romano, 1978) snakes (Ophidia: Dipsadidae): Morphological, cytochemical and ultrastructural studies.

Hematopoiesis in snakes begins during embryogenesis and the process changes through fetal life. The first erythropoietic activity is extraembryonic from mesoderm cells of the yolk sac and during the embryonic development it becomes intraembryonic. In newborn and adult snakes, the main site of hematopoiesis occurs in the bone marrow. The aim of this study was to characterize different stages of blood cells maturation of *O. guibei* snakes, based on microscopic studies including cytochemical stains and ultrastructural features. Fragments of vertebrae of newborn and adult snakes (n= 11) were collected to obtain bone marrow that was fixed in Bouin or formol calcium and processed routinely for histology. Tissue sections, *imprint* of bone marrow and blood smears were stained with Rosenfeld, hematoxylin and eosin or methylene blue. The cytochemical reactions performed were periodic acid-Schiff (PAS), toluidine blue (AT), sudan black B (SBB), benzidine peroxidase (BP) and acid phosphatase (FA). For transmission electron microscopy (MET), bone marrow was fixed in paraformaldehyde 4% + glutaraldehyde 2% in Tyrode buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812 resin. Most of progenitors of blood cells were identified in the active hematopoietic focus in bone marrow of vertebrae and ribs. The azurophilic and lymphocytic series were morphologically similar to those of other reptiles. Granulocytic lineage was classified as myeloblast, promyelocyte, myelocyte and mature granulocytes. **Myelocyte** can be differentiated into basophils, with large, round and electrondensity homogeneous granules or heterophils, with varied size and shapes granules in the TEM analysis. AT and PAS were positive in the immature and mature basophils granules. On the other hand, heterophils and azurophils showed strong positive reaction for lipids staining of SBB and BP. FA was found on azurophils in various stages of maturation. The different stages of erythrocytes were classified as: proerythroblast, basophilic erythroblast, polychromatic erythroblast, proerythrocyte and mature erythrocytes. Thrombocytic cells showed PAS positive. The characteristics of mature and immature thrombocytes were defined using TEM identifying the dense bodies, alpha granules, microtubules and open canalicular system. Concluding, the rib or vertebral bone marrow is an important hematopoietic site in the newborn and adult *O. guibei* snakes. The morphologic, cytochemical and ultrastructural characteristics are useful to identify and characterize different stages of maturation of blood cells.

Keywords: Hematopoiesis, blood cells, bone marrow, snakes, cell maturation.

Referências Bibliográficas

X. Referências Bibliográficas

Abdelhay ESF, Paraguaçu-Braga FH, Binato R, Bouzas LFS (2009). Células-tronco de origem hematopoética: expansão e perspectivas de uso terapêutico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** 31: 2-8.

Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE (1999). Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). **American Journal of Veterinary Research** 60(4): 507-514.

Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE (1992). Morphological and cytochemical characteristics of blood-cells from the desert tortoise (*Gopherus Agassizii*). **American Journal of Veterinary Research**. 53(9): 1645-1651.

Allender MC, Mitchell MA, Phillips CA, Gruszynski K, Beasley VR (2006). Hematology, plasma biochemistry, and antibodies to select viruses in wild-caught Eastern massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus catenatus*) from Illinois. **Journal of Wildlife Diseases** 42(1): 107-114.

Azevedo A, Casaletti L, Lunardi LO (2002). Morphology and histoenzymology of eosinophilic granulocytes in the circulating blood of the turtle (*Chrysemys dorbignii*). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology** 34(3): 265-269.

Azevedo A, Lunardi LO (2003). Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorbignii*). **Acta Histochemica** (105): 99-105.

Bakondi B, Spees JL (2010). Human CD133-derived bone marrow stromal cells establish ectopic hematopoietic microenvironments in immunodeficient mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 400: 212-218.

Bancroft J, Gamble M (2006). **Teory and practice of histological techniques**. 5ª edição edn. Elsevier Churchill Livingstone: Edinburgh.

Baumann R, Dragon S (2005). Erythropoiesis and red cell function in vertebrate embryos. **European Journal of Clinical Investigation** 2-12.

Behnke O (1970). A comparative study of microtubules of disk-shaped blood cells. **Journal Ultrastructure Research** 31: 61-75.

Belamarich FA, Fusari MH, Shepro D, Kien M (1966). *In vitro* studies of aggregation of non-mammalian thrombocytes. **Nature** 212: 1579-1580.

Bernard J, Lévy JP, Clauvel JP, Rain JD, Varet B (1989). **Manual de hematologia**. 3ª edn. Santos: São Paulo.

Blofield BA, Short L, Samour HJ, Ball D, Hawkey CM (1992). Phylogenetic and haematological implications of differences in the morphology of the heterophil nucleus in reptiles. **Journal of Zoology** 226: 539-549.

Bounous DI, Dotson RL, Brooks Jr RL, Ramsay EC (1996). Cytochemical staining and ultrastructural characteristics of peripheral blood leucocytes from the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). **Comparative Haematology Internacional** 6: 86-91. London.

Brew MC, Figueiredo JAP (2003). **Histologia geral para odontologia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.

Campbell TW (2006). Clinical pathology of reptiles. *In*: Mader DR (ed). **Reptile medicine and surgery**, 2ª edn. Philadelphia: Saunders Elsevier. pp 453-470.

Canfield PJ (1998). Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. **Australian Veterinary Journal** 76(12): 793-800.

Carvalho RL, Antoniazzi MM, Jared C, Silva AMJ, Santos AA, Egami MI (2006). Morphological, cytochemical, and ultrastructural observations on the blood cells of the reptile *Tupinambis merianae* (Squamata). **Comparative Clinical Pathology** 15(3): 169-174.

Casal AB, Oros J (2007). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Research in Veterinary Science** 82(2): 158-165.

Cavalc CL Caracterização do desenvolvimento e da hematopoese embrionária da serpente falsa-coral *Oxyrhopus guibei* (Serpentes: Dipsadidae) a partir da ovoposição. **Dissertação Mestrado**, Universidade de São Paulo, 2009.

Caxtonmartins AE (1978). Cytochemistry of blood cells in 2 West-African Amphibians. **Journal of Anatomy** 125: 231-235.

Chudzinski AM, Seelaender MCL, Kelen EMA (1990). Standardization of anaesthesia with pentobarbital in the snake *Bothrops jararaca*. **Memorias do Instituto Butantan** (São Paulo) 51(4): 147-152.

Claver JA, Quaglia AIE (2009). Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine** 18(2): 87-97.

Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN (2006). **Hemostasis e thrombosis: Basic principles and clinical practice**. 5ª edn. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

Dabrowski Z, Martins ISS, Tabarowski Z, Witkowska-Pelc E, Morena DDS, Spodaryk K, *et al.* (2007). Haematopoiesis in snakes (Ophidia) in early postnatal development. **Cell and Tissue Research** 328(2): 291-299.

- Dacie JV, Lewis SM (1991). **Practical Haematology**. 7ª edn. Churchill Livingstone.
- Daimon T, Gotoh Y, Kawai K, Uchida K (1985). Ultrastructural distribution of peroxidase in thrombocytes of mammals and submammals. **Histochemistry** 82: 345-350.
- Daimon T, Gotoh Y, Uchida K (1987). Electron-microscopic and cytochemical studies of the thrombocytes of the tortoise (*Geoclemys reevesii*). **Journal of Anatomy** 153: 185-190.
- DaMatta RA, Seabra SH, De Souza W (1998). Further studies on the phagocytic capacity of chicken thrombocytes. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology** 30(2): 271-277.
- Doig K (2002). Erythrocyte production and destruction. In: Rodak BF (eds). **Hematology - Clinical principles and applications**, 2ª edn: Saunders. pp 77-93.
- Esteban MA, Meseguer J, Ayala AG, Agulleiro B (1989). Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) - an ultrastructural-study. **Archives of Histology and Cytology** 52(4): 407-419.
- Franco FL (2003). Origem e diversidade das serpentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V (eds). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, edn. São Paulo: Sarvier. pp 13-32.
- Frank G (1989). Granulopoiesis in tadpoles of *Rana esculenta*. Ultrastructural observations on the developing granulocytes and on the development of eosinophil granules. **Journal of Anatomy** 163: 97-105.
- Ganong WF (1999). **Fisiologia médica**. 19ª edn. Mc Graw Hill do Brasil: Rio de Janeiro.
- Garner MM, Homer BL, Jacobson ER, Raskin RE, Hall BJ, Weis WA, *et al.* (1996). Staining and morphologic features of bone marrow hematopoietic cells in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). **American Journal of Veterinary Research** 57(11): 1608-1615.
- Grego KF, Alves JAS, de Albuquerque LCR, Fernandes W (2006). Hematological references for wild recently-caught white-tailed lancehead (*Bothrops leucurus*). **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia** 58(6): 1240-1243.
- Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control expansion and differentiation. In: **Experimental Cell Research** Vol. 306, pp 330-335
- Hansel DE, Dintzis RZ (2007). **Fundamentos de Rubin - Patologia**. 1ª edn. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.

- Harr KE, Alleman AR, Dennis PM, Maxwell LK, Lock BA, Bennett RA, *et al.* (2001). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 218(6): 915-921.
- Hayhoe FGJ, Quaglino D (1994). **Haematological cytochemistry**. 3ª edn. Churchill Livingstone: New York.
- Hildebrand M, Goslow G (2006). **Análise da estrutura dos vertebrados**. 2ª edn. Atheneu: São Paulo.
- Jamra M, Lorenzi TF (1983). **Leucócitos, leucemias e linfomas**. edn. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Junqueira L, Carneiro J (2004). **Histologia básica**. 10ª edn. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Kardong KV (2010). **Vertebrados - Anatomia comparada, função e evolução**. edn. Rocca: São Paulo.
- Khanna-Gupta A, Berliner N (2005). Granulocytopoiesis and monocytopenia. *In*: Hoffman R, Benz JJ, Shattil SJ, Bruce F, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P (eds). **Hematology - Basic principles and practice**, 4ª edn. United States of America: Elsevier. p[^]pp.
- Knotkova Z, Doubek J, Knotek Z, Hajkova P (2002). Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). **Acta Veterinaria Brno** 71(2): 191.
- Lee KG, Miller T, Anastassov I, Cohen WD (2004). Shape transformation and cytoskeletal reorganization in activated non-mammalian thrombocytes. **Cell Biology International** 28: 299-310.
- Lichtman MA, Beutler E, Kiips TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (2005). **Williams Hematology**. 7ª edn. McCraw Hill Medical: New York.
- Lorenzi TF (2003). **Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica**. 3ª edn. Medsi.
- Manso PPdA, Brito-Gitirana Ld, Pelajo-Machado M (2009). Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Cell and Tissue Research** 337(2): 301-312.
- Martinez-Silvestre A, Marco I, Rodriguez-Dominguez MA, Lavin S, Cuenca R (2005). Morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of the blood cells of the giant lizard of El Hierro (*Gallotia simonyi*). **Research in Veterinary Science** 78(2): 127-134.
- Mateo MR, Roberts ED, Enright FM (1984). Morphologic, cytochemical, and functional-studies of peripheral-blood cells of young healthy american alligators

(*Alligator-mississippiensis*). **American Journal of Veterinary Research** 45(5): 1046-1053.

Melgarejo AR (2003). Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V (eds). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, edn. São Paulo: Sarvier. pp 33-61.

Meseguer J, Esteban MA, Ayala AG, Ruiz AL, Agulleiro B (1990). Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus-labrax*) - an ultrastructural-study. **Archives of Histology and Cytology** 53(3): 287-296.

Meseguer J, Esteban MA, Rodriguez A (2002). Are thrombocytes and platelets true phagocytes? **Microscopy Research and Technique** 57: 491-497.

Mitchell RN (2005). **Distúrbios hemodinâmicos, doença tromboembólica e choque**. 7ª edn. China: Elsevier.

Moura WL, Carvalho VAL, Santos AA, Egami MI, Silva MR, Yamamoto M (2005). Morphologic characteristics characteristics of cells on the erythrocytic series of the *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802; Reptilia, crocodilia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 42(5): 319-326.

Moura WL, Matushima ER, Oliveira LW, Egami MI (1999). Morphological and cytochemical observations of blood cells of *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 36(1-3): 45-50.

Otis VS (1973). Hemocytological and serum chemistry parameters of the African puff adder, *Bitis arietans*. **Herpetologica** 29(2): 110-116.

Ozzetti PA Estudos hematológicos das serpentes *Oxyrhopus guibei* e *Xenodon newwiedii* (Ophidia: Colubridae). **Trabalho de Conclusão de Curso**, 2009.

Pannerden HN, Hass F, Geerts W, Posthuma G, Dijk S, Heijnen HFG (2010). The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular α -granule subtypes. **Blood** 116(7): 1147-1156.

Pienaar UV (1962). **Haematology of some South African Reptiles**. Witwatersrand University Press: Johannesburg.

Pizzato L, Marques OAV (2002). Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* (Colubridae). In: **Amphibia-Reptilia** 23: 495-504.

Quixabeira VB, Saddi VA (2008). A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. In: **Revista Brasileira de Análises Clínicas** Vol. 40, pp 199-202.

Rosenfeld G (1947). Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudos de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan** 20: 315-328.

Roskopf WJJ, Woerpel RW, Yanoff SR (1982). Normal hemogram and blood chemistry values for *Boa constrictors* and *Pythons*. **Veterinary Medicine - Small Animal Clinician** 77: 822-823.

Ryerson DL (1943). Separation of the two acidophilic granulocytes of the turtle blood, with suggest phylogenetic relationships. *In*: **Anatomical Record** Vol. 85, pp 25-48.

Sacchi R, Pupin F, Zuffi MA, Scali S, Boncompagni E, Binda A, *et al.* (2007). Blood cell morphology of the morrish gecko *Tarentola mauritanica*. **Amphibia-Reptilia** 28: 503-508.

Salakij C, Salakij J, Apibal S, Narkkong NA, Chanhom L, Rochanapat N (2002a). Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). **Veterinary Clinical Pathology** 31(3): 116-126.

Salakij C, Salakij J, Narkkong N (2003). Hematology and ultrastructure of blood cells in banded krait (*Bungarus fasciatus*). **Journal of Electron Microscopy Society of Thailand** 17(1): 55-60.

Salakij C, Salakij J, Suthunmapinunta P, Chanhom L (2002b). Hematology, morphology and ultrastructure of blood cells and blood parasites from puff-faced watersnakes (*Homalopsis buccata*). **Kasetsart Journal Natural Sciences** 36(1): 35-43.

Sano-Martins IS Hematologia comparada de serpentes *Bothrops jararaca* e *Waglerophis merremii*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, 1978.

Sano-Martins IS, Dabrowski Z, Tabarowski Z, Witkowska-Pelc E, Morena DDS, Spodaryk K (2002). Haematopoiesis and a new mechanism for the release of mature blood cells from the bone marrow into the circulation in snakes (Ophidia). **Cell and Tissue Research** 310(1): 67-75.

Sanomartins IS, Jared C, Brunner A (1994). Ultrastructural alterations in thrombocytes of the snake waglerophis-merremii after activation by adp. **Comparative Haematology International** 4(4): 226-231.

Sazima I, Haddad CFB (1992). **Répteis da Serra do Japi: notas sobre história natural**. São Paulo.

Schmidt-Nielsen K (2002). **Fisiologia animal - Adaptação e meio ambiente**. 5ª edn. Santos: São Paulo.

Serapicos EO, Merusse JLB (2006). Morfologia e histoquímica das glândulas de Duvernoy e supralabial de seis espécies de colubrídeos opistoglifodontes (serpentes: Colubridae). **Papéis avulsos de Zoologia** 46.

Sheehan HL, Storey GW (1947). An improved method of staining leucocyte granules with sudan black-b. **Journal of Pathology and Bacteriology** 59(1-2): 336-&.

Smith L (2007). Hematopoetic theory. *In*: Rodak BF, Fritsma GA, Doig K (eds). **Hematology - Clinical principles and applications**, 3ª edição edn. Missouri: Elsevier Health Science. p^pp 57-76.

Storer TI, Usinger RL, Stebbins RC, Nybakken JW (2003). **Zoologia geral**. 6ª edn. Companhia Editora Nacional: São Paulo.

Swirsky D, Bain BJ (2006). Erythrocyte and leucocyte cytochemistry. **Practical Haematology**, 10ª edição edn. Philadelphia: Elservier.

Vermeylen J, Verstraete M (1982). **Hemostasia**. 1ª edn. Editora Sarvier: São Paulo.

Wojtszek JS (1991). Haematology of the grass snake *Natrix natrix natrix* L. **Comparative Biochemistry Physiology** 100A: 805-881.

Work TM, Raskin RE, Balazs GH, Whittaker SD (1998). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. **American Journal of Veterinary Research** 59(10): 1252-1257.

Zon LI (1995). Developmental biology of hematopoiesis. **Blood** 86(8): 2876-2891.

Biografia

XI. Biografia

Formação acadêmica:

2005-2009 Graduação em Ciências Biológicas
Centro Universitário São Camilo – Campus Pompéia (São Paulo).

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC-CNPq).

Título: Estudos hematológicos das serpentes *Oxyrhopus guibei* e *Xenodon neuwiedii* (Ophidia: Colubridae).

Orientadora: Dra. Ida Sigueko Sano-Martins.

Apresentações de Trabalho

1. Ozzetti, P. A.; Cavlac, C. L.; Sano-Martins, I. S. Hematopoiesis in *Oxyrhopus guibei* (Ophidia: Dipsadidae) snakes: morphological and cytochemical characterization. 2012. (Apresentação de Trabalho/Seminário). XIV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan.

2. Costa, L. I. A.; **Ozzetti, P. A.;** Sano-Martins, I. S. Morphologic, cytochemical and ultrastructural characteristics of blood cells *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) and *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae). 2012. (Apresentação de Trabalho/Seminário). XIV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan.

3. Cavlac, C. L.; **Ozzetti, P. A.;** Sano-Martins, I. S. Embryonic hematopoiesis in the snake *Oxyrhopus guibei* (Dipsadidae, Xenodontidae). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso). IX Congresso Latinoamericano de Herpetologia.

4. Ozzetti, P. A.; Cavlac, C. L.; Sano-Martins, I. S. Eritropoese e granulopoese da serpente *Oxyrhopus guibei* (Ophidia: Dipsadidae). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso). IX Congresso Latinoamericano de Herpetologia.

5. Ozzetti, P. A.; Cavlac, C. L.; Sano-Martins, I. S. Hematopoese de embriões e recém nascidos da serpente *Oxyrhopus guibei* (Ophidia: Dipsadidae): Caracterização das fases de maturação da série eritrocítica e granulocítica. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso). Hemo 2011 - Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia.

6. Ozzetti, P. A.; Costa, L. I. A.; Sano-Martins, I. S. Cytochemical and morphologic features of bone marrow hematopoietic cells in *Oxyrhopus guibei* (Ophidia: Dipsadidae). 2011. (Apresentação de Trabalho/Seminário). XIII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan.

7. Ozzetti, P. A.; Costa, L. I. A.; Sano-Martins, I. S. Morphological and cytochemical characteristics of blood cells from *Oxyrhopus guibei* (Dipsadidae) and *Bothrops*

jararaca(Viperidae) snakes. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso). XV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular.

8. Costa, L. I. A.; **Ozzetti, P. A.**; Sano-Martins, I. S. Cytochemical characterization of blood cells of the snakes *Oxyrhopus guibei* and *Xenodon neuwiedii*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Seminário). XII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan.