



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Neiva Aparecida Grazziotin

MORTE CELULAR  
EM ERITRÓCITOS NUCLEADOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Neiva Aparecida Grazziotin e aprovada pela Comissão Julgadora. 17/05/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

9914866

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	38.201
	229/99
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/08/99
N.º CPD	

CM-00125558-2

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**Grazziotin, Neiva Aparecida**

**G796m** Morte celular em eritrócitos nucleados/Neiva Aparecida  
Grazziotin. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.  
54f.:ilus.

Orientadora: Maria Luiza Silveira Mello  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Eritrócitos. 2. Citoquímica. 3. Apoptose . I. Mello, Maria  
Luiza Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

**Data da Defesa: 17/05/1999**

**Banca Examinadora**

**Titulares:**

Profa.Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Orientadora)



Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

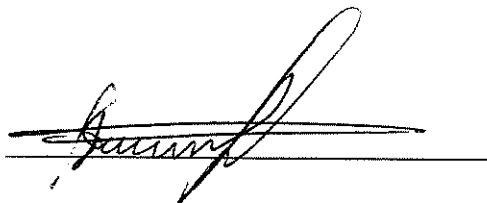


Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti



**Suplente:**

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



A minha orientadora **Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello** pelo carinho, orientação, apoio e considerações importantes que possibilitaram a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. Formação e destruição de eritrócitos humanos e de mamíferos em geral.....	01
1.2. Formação e destruição de eritrócitos nucleados.....	04
1.3. Considerações sobre morte celular.....	07
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
3.1. Material.....	12
3.2. Métodos.....	12
3.2.1. Obtenção dos preparados.....	12
3.2.2. Citoquímica e Imunocitoquímica.....	13
3.2.2.1. Reação de Feulgen.....	13
3.2.2.2. Coloração pelo Azul de Toluidina a pH 4,0.....	13
3.2.2.3. Método de Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC).....	14
3.2.2.4. Método de TUNEL.....	14
3.2.2.5. Reação controle para Imunocitoquímica.....	16
3.2.3. Análise e documentação fotográfica.....	16
3.2.4. Análise estatística.....	17

<b>4. RESULTADOS</b> .....	18
4.1. Observações qualitativas.....	18
4.2. Observações quantitativas.....	28
4.3. Análise estatística.....	32
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41

## RESUMO

Esta investigação teve por objetivo detectar e caracterizar a frequência de fenômenos de morte celular programada (MCP) em eritrócitos nucleados, tendo por justificativa o fato de que a concentração crítica de eletrólitos (CEC) na cromatina de eritrócitos de frango é variada, sugerindo alterações nos complexos DNA-proteína de parte da população celular. Eritrócitos de frango, pombo e rã foram analisados por citoquímica e pelo método imunocitoquímico de TUNEL para avaliação de MCP. Os resultados indicaram que a maioria da população celular se encontrava em alguma fase ativa do processo de MCP, evidenciado especialmente pela variada intensidade de resposta nuclear ao método de TUNEL e que é sugestiva de alterações químicas e de estereoarranjo nos complexos DNA-proteína desses núcleos. A alta frequência de MCP revelada pelo método de TUNEL estaria de acordo com os dados reportados de CEC na cromatina de eritrócitos de frango. A resposta mais intensa ao método de TUNEL nos eritrócitos de rã em relação às aves pode estar associada ao tempo de vida mais curto dos primeiros e a variantes em histona H5, que fariam com que o acesso do DNA à fragmentação por endonucleases e, conseqüentemente, ao método imunocitoquímico fossem diferentes.

## **ABSTRACT**

The objective of this investigation is to detect and characterize the frequency of programmed cell death (PCD) phenomena in nucleated erythrocytes, having as justification the fact that the critical electrolyte concentration (CEC) in chicken erythrocytes chromatin is varied, suggesting alterations in the DNA-protein complexes in part of the cellular population. Chicken, pigeon and frog erythrocytes have been analyzed by cytochemistry and immunocytochemical TUNEL assay for PCD avaluation. The results have shown that the majority of cellular population was in some active phase of PCD process, evidenced especially by the varied intensity of nuclear response to the TUNEL assay and which suggests chemical and stereoarrangement alterations in the DNA-protein complexes of these nuclei. The high frequency of PCD revealed by the TUNEL assay would be in agreement with the reported CEC data in chicken erythrocyte chromatin. The most intense response to the TUNEL assay in frog erythrocytes regarding fowls can be associated with a shorter life span of the former and the histone H5 variants which would cause the DNA access to fragmentation by endonucleases and, consequently, to the immunocytochemical assay, to be different.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Formação e Destruição de Eritrócitos Humanos e de Mamíferos em geral

Os eritrócitos constituem o maior número de células do sangue variando, no homem, de 4,5 a 5,5 milhões/mm<sup>3</sup> e tendo como função o carreamento de oxigênio necessário aos processos oxidativos do corpo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). As células do sangue circulante são constantemente renovadas pela proliferação de células-fonte localizadas nos tecidos hematopoiéticos. As primeiras células sangüíneas surgem nas ilhotas sangüíneas situadas no mesoderma do saco vitelino, no início da vida pré-natal. Posteriormente, aparecem centros hematopoiéticos temporários no fígado e no baço. A medula óssea torna-se então cada vez mais importante como local de produção de células sangüíneas, diminuindo o papel do fígado. Após o nascimento, a medula produz os eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e linfócitos (estes produzidos também em outros tecidos linfóides). Durante a infância a formação sangüínea fica restrita aos ossos chatos e extremidades dos ossos longos (ROSS *et al.*, 1993; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NELSON & DAVEY, 1995).

As células sangüíneas originam-se na medula óssea a partir de células denominadas Células Tronco Hematopoiéticas Pluripotenciais (PHCS), que originam duas linhas progenitoras: a Célula Precursora Linfóide e a Célula Precursora Mielóide ou Hematopoiética, tipos celulares morfologicamente semelhantes a pequenos e médios linfócitos (GUYTON, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NELSON & DAVEY, 1995). A diferenciação para as várias linhagens de células parece ser determinada por influências microambientais. A Célula Precursora Mielóide origina a Unidade Eritróide Formadora de Brotamento (BFU-E) que se encontra na medula e em pequena quantidade no sangue periférico, necessita dos linfócitos T para seu crescimento ótimo e é estimulada pela interleucina 3 e eritropoietina formando a Unidade Eritróide Formadora de Colônia (CFU-E). Baixas

concentrações de eritropoietina estimulam a CFU-E, formando proeritroblastos, reconhecíveis morfologicamente, que iniciam o processo de eritropoiese (NELSON & DAVEY, 1995).

O proeritroblasto é uma célula grande medindo cerca de 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e possuindo núcleo esférico, central, com padrão de cromatina fina, um ou dois nucléolos e membrana nuclear proeminente. O citoplasma é moderadamente basófilo devido à presença de numerosos polirribossomos. Sintetiza proteínas intensamente e divide-se ativamente. Há pequena síntese de hemoglobina.

O proeritroblasto sofre mitose, originando o eritroblasto basófilo, que é um pouco menor, seu núcleo contém cromatina condensada em grânulos grosseiros, nucléolos nem sempre visíveis e citoplasma fortemente basófilo devido à abundância de polirribossomos. Sofre mitose originando o eritroblasto policromático.

O eritroblasto policromático é menor que a célula precedente, seu núcleo contém cromatina mais condensada e sua policromasia evidencia a produção contínua de hemoglobina no citoplasma. A mistura da acidofilia com a basofilia ainda existente confere tonalidades variáveis de cinza ao citoplasma, quando as células são coradas com corantes hematológicos como Leishman ou Giemsa. Sofre uma ou duas divisões mitóticas, originando o eritroblasto ortocromático.

O eritroblasto ortocromático ou normoblasto possui um diâmetro de 8-10  $\mu\text{m}$ , núcleo pequeno e denso (picnótico), e citoplasma acidófilo devido à abundância de hemoglobina, apresentando traços de basofilia. A mitose não mais ocorre. Esta célula ejeta seu núcleo e pequena camada de citoplasma, que são fagocitados pelos macrófagos da medula óssea, e a parte anucleada forma o reticulócito. Tratando-se essa célula com azul de cresil, os polirribossomos precipitam, formando um retículo, daí a denominação reticulócito.

Ao microscópio eletrônico observam-se muitos polirribossomos e algumas mitocôndrias no reticulócito. Este sintetiza hemoglobina para completar sua maturação, mas sua síntese protéica cessa em pouco tempo, pois os polirribossomos não podem ser renovados devido à ausência do núcleo.

Os reticulócitos permanecem no estroma medular dois ou três dias antes de atravessarem a parede dos capilares sinusóides e penetrarem na corrente sanguínea onde, no homem, permanecem cerca de um dia e constituem 1 a 2% dos eritrócitos

circulantes. Esta porcentagem aumenta quando há necessidade de aumento no número de eritrócitos, por exemplo, após uma hemorragia (ROSS *et al.*, 1993; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NELSON & DAVEY, 1995). Na corrente sanguínea os eritrócitos são anucleados e, no homem, apresentam-se como discos bicôncavos com diâmetro de 6-8  $\mu\text{m}$  (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995), com espessura de 2,6  $\mu\text{m}$  na sua margem e 0,8  $\mu\text{m}$  na região central (ROSS *et al.*, 1993). São células elásticas que se deformam facilmente ao atravessarem capilares estreitos. A forma bicôncava proporciona uma grande superfície em relação ao volume, facilitando a troca de gases. Ao microscópio eletrônico, observa-se que os eritrócitos são desprovidos de organelas e seu interior é constituído por material denso e finamente granular. Sua membrana celular é um componente funcional, rico em enzimas. Transporta hemoglobina que é constituída por quatro grupos heme (que contêm ferro) e quatro cadeias polipeptídicas (ROSS *et al.*, 1993).

Há vários tipos de hemoglobina, dependendo das variações das cadeias polipeptídicas. As hemoglobinas A1, A2 e F são consideradas normais. Em um adulto normal, a hemoglobina A1 (Hb A1) representa 97% do total de hemoglobina, a hemoglobina A2 (Hb A2) 2% e a hemoglobina fetal (Hb F) 1%. O feto possui 100% de Hb F, o recém nascido 80% e no oitavo mês de vida a taxa é semelhante à do adulto, ou seja 1% (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Os eritrócitos humanos têm vida média de 120 dias. Neste tempo envelhecem gradualmente, certas atividades enzimáticas diminuem, tornando-se frágeis e sujeitos a rompimentos, sendo removidos da circulação pelos macrófagos do sistema retículo endotelial (ROSS *et al.*, 1993; ALBERTS *et al.*, 1994; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NELSON & DAVEY, 1995). À medida que as células vermelhas envelhecem, perdem ácido siálico de seu glicocálix modificando sua superfície química. A baixa taxa de ácido siálico em suas membranas promove o reconhecimento dessas células pelos macrófagos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1991; NELSON & DAVEY, 1995).

No macrófago, a hemoglobina é degradada em seus três constituintes: ferro, protoporfirina e globina. O ferro é liberado para o plasma e transportado pela transferrina até à medula óssea para a produção de novos eritrócitos ou até ao fígado e outros tecidos para ser armazenado na forma de ferritina. Quantidades menores de ferro são armazenadas na sua forma insolúvel, denominada hemossiderina

(GUYTON, 1992). O anel de protoporfirina é convertido pelos macrófagos até bilirrubina que é liberada para o sangue e transportada pela albumina plasmática para o fígado, onde é acoplada ao ácido glicurônico formando um conjugado hidrossolúvel, que é excretado na bile. No intestino a bile é reduzida por bactérias, formando estercobilinogênio e urobilinogênio que em parte são reabsorvidos. A globina é degradada por proteases celulares em seus aminoácidos que são reaproveitados pelo organismo para síntese protéica (NELSON & DAVEY, 1995).

No sistema hematopoiético dos vertebrados  $10^{11}$  eritrócitos senescentes são removidos a cada dia num adulto humano. Esta morte celular programada regula o número de células sangüíneas diferenciadas e depende da ativação de um programa suicida intracelular (ALBERTS *et al.*, 1994).

## **1.2. Formação e Destruição de Eritrócitos Nucleados**

Os eritrócitos nucleados ocorrem em aves e animais vertebrados inferiores (GÜRTLER *et al.*, 1987), têm origem semelhante à dos eritrócitos dos mamíferos, descrita no item 1.1., formando-se principalmente na medula óssea (HOFFMANN & VÖLKER, 1969; HODGES, 1974; STORER & USINGER, 1976; SWENSON, 1988; BANKS, 1992). Uma grande variedade de órgãos funciona como tecido hematopoiético nos vertebrados adultos (ROMER & PARSONS, 1985). O potencial hematopoiético da medula óssea (inativa), fígado, baço e linfonodos permanece presente no adulto, podendo recuperar sua potencialidade diante de anemia grave e prolongada (SWENSON, 1988). Em aves, o fígado também é importante como fonte de células sangüíneas (SWENSON, 1988); em anfíbios, o rim colabora com a hematopoiese (ROMER & PARSONS, 1985).

A maturação dos eritrócitos nucleados se processa de modo diferente dos eritrócitos anucleados dos mamíferos. Nos eritrócitos nucleados a síntese de hemoglobina vai aumentando no decorrer da maturação, sem que o núcleo atrofie e seja expelido; estes reticulócitos e eritrócitos, portanto, diferem daqueles por conter núcleo. Os eritrócitos de frango apresentam respiração relativamente baixa e

glicólise intensa; os eritrócitos de pombo apresentam comportamento inverso (GÜRTLER *et al.*, 1987).

Os eritrócitos do sangue das aves são células ovais (HODGES, 1974; GÜRTLER *et al.*, 1987; BANKS, 1992), apresentam uma forma biconvexa (GÜRTLER *et al.*, 1987) e possuem entre 10-13  $\mu\text{m}$  de comprimento e 6-7  $\mu\text{m}$  de largura. Seu núcleo é central, oval, tem aproximadamente a metade das dimensões celulares, sua cromatina condensada pode estar uniformemente distribuída e não há presença de nucléolos. O citoplasma pode variar do laranja-rosado ao vermelho, após colorações hematológicas rotineiras (BANKS, 1992).

O diâmetro dos eritrócitos de frango é de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$  : 7,5  $\mu\text{m}$  e o de seu núcleo, 5,5  $\mu\text{m}$  : 3,5  $\mu\text{m}$ ; em pombos, é de aproximadamente 13  $\mu\text{m}$  : 6,5  $\mu\text{m}$  (HOFFMANN & VÖLKER, 1969).

Os eritrócitos dos peixes e anfíbios são morfologicamente semelhantes aos das aves (BANKS, 1992). Na rã, possuem um diâmetro em torno de 23  $\mu\text{m}$  : 14  $\mu\text{m}$  (STORER & USINGER, 1976).

Em aves e outras espécies filogeneticamente inferiores aos mamíferos, os trombócitos se parecem com os eritrócitos. São células nucleadas, normalmente ovais, com dimensões médias de 9  $\mu\text{m}$  : 5  $\mu\text{m}$ . O núcleo arredondado e centralmente localizado possui massas granuladas densas de heterocromatina. O citoplasma é finamente reticulado e basófilo (BANKS, 1992) e não contém hemoglobina (HOFFMANN & VÖLKER, 1969). Além de atuar na hemostasia, de forma semelhante às plaquetas dos mamíferos, os trombócitos demonstram ser fracamente fagocíticos (KUSUDA & IKEDA, 1987; BANKS, 1992). Devido a sua função fagocitária, foi sugerido sua classificação como leucócitos em estudos com peixes (KUSUDA & IKEDA, 1987).

O tempo de vida dos eritrócitos de aves é de 30-40 dias (HOFFMANN & VÖLKER, 1969; GÜRTLER *et al.*, 1987); em rãs é, em média, 24 dias (BACA SARAVIA, 1961).

A curta sobrevivência dos eritrócitos de frango tem sido atribuída à elevada taxa metabólica e à alta temperatura corporal destas aves (SWENSON, 1988). À medida em que os eritrócitos de aves envelhecem, a cromatina nuclear tende a

tornar-se condensada e mais fortemente corada nas células degeneradas com núcleo picnótico, as quais raramente são encontradas em esfregaços do sangue periférico (HODGES, 1974), pois são normalmente removidas pelas células retículo endoteliais de diferentes órgãos, principalmente pelo baço (HOFFMANN & VÖLKER, 1969; HODGES, 1974; BANKS, 1992). Embora as alterações morfológicas no envelhecimento normal dos eritrócitos não sejam visíveis, as vias metabólicas encontram-se alteradas (BANKS, 1992).

A cromatina dos eritrócitos de frango é conhecida por apresentar alta estabilidade físico-química. Contribui para esse fenômeno a presença de uma variante especial de histona H1 conhecida como H5 (SUN *et al.*, 1990).

É admitido que H5 participe em mecanismos de compactação da cromatina (CLARK & THOMAS, 1988; SUN *et al.*, 1990), sendo demonstradas em eritrócitos de frango algumas propriedades citoquímicas (ex. concentração crítica de eletrólitos) semelhantes às da cromatina de certos grupos de espermatozoides portadores de tipos especiais de H1 (FALCO *et al.*, 1998). Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) é o valor da molaridade de um cátion inorgânico (ex.  $Mg^{2+}$ ), o qual adicionado a uma solução de azul de toluidina ou utilizado imediatamente após a coloração com a mesma, promove o desaparecimento da metacromasia (cor violeta) do substrato específico (VIDAL & MELLO, 1989; MELLO *et al.*, 1993; MELLO, 1997). No seu ponto de CEC, o substrato, que se corava em violeta pelo azul de toluidina, passa a se corar em verde. Os estudos de CEC se aplicam a complexos de DNA-proteína, RNA-proteína e DNA-RNA, em associação com diferentes estados de supra-organização cromatínica (MELLO, 1997). Deve-se salientar que os sítios de ligação eletrostática seja do azul de toluidina, seja dos cátions  $Mg^{+2}$  são os grupos fosfatos disponíveis dos ácidos nucleicos.

Dados de CEC indicam que a disponibilidade de grupos fosfatos do DNA e graus de compactação do complexo DNA-proteína na cromatina dos eritrócitos de frango possam variar em preparados em que a fixação e outros tratamentos propiciem alterações no estado de compactação desse complexo, em parte da população celular (FALCO *et al.*, 1998).

Considerando-se os fenômenos hemocateréticos a que essas células serão submetidas, para que as mesmas sejam removidas da corrente circulatória, sinais

especiais em sua superfície deverão identificá-las como o final de seu *life span*. Simultaneamente, alterações em seu núcleo, deverão ocorrer (VIDAL, 1997). Admite-se que esses fenômenos que caracterizariam morte celular estariam se manifestando em parte da população celular circulante e poderiam ser os responsáveis pela variabilidade em resultados de CEC da cromatina detectados neste laboratório (FALCO *et al.*, 1998).

A caracterização de apoptose, através de métodos citoquímicos, em eritrócitos de frango, poderia esclarecer tal questão.

### 1.3. Considerações sobre Morte Celular

Vários termos surgiram na literatura para indicar a morte celular: apoptose, necrose, necrose por coagulação, autólise, morte celular fisiológica, morte celular programada, cromatólise, cariorréxis, cariólise e célula suicida. MAJNO e JORIS (1995) descreveram duas modalidades de morte celular: morte celular por apoptose (“suicídio”) e morte celular acidental (“assassinato”). Oncose indicaria morte celular com inchaço (*ónkos*) que ocorreria como parte da morte celular acidental e isquêmica. Segundo esses autores, necrose não seria um termo apropriado por se referir a alterações subsequentes à morte celular, seja morte celular acidental ou “suicida”, sem indicar a forma desta morte. No entanto, esta terminologia encontra uso mais divulgado, como sinônimo de morte acidental catastrófica (MELLO *et al.*, 1998). Oncose leva a necrose com cariólise, apoptose ao contrário leva a necrose com cariorréxis e encolhimento celular. Morte celular programada refere-se a situações onde as células estão programadas a morrer em um tempo pré-determinado. Em muitas situações, portanto, os mecanismos bioquímicos e morfológicos são distintos dos da apoptose, recomendando-se não usar este termo como sinônimo de apoptose (MAJNO & JORIS, 1995).

Quando estímulos fisiológicos promovem a indução ou a antecipação da morte celular programada, o fenômeno é conhecido por apoptose (MELLO *et al.*, 1998).

KERR, WYLLIE e CURRIE (1972) propuseram o termo apoptose para designar uma distinta morfologia de morte celular. Estes autores apontam dois padrões de morte celular: apoptose e necrose.

Células apoptóticas são caracterizadas pela condensação citoplasmática e nuclear, que resulta no desmonte da célula em corpos apoptóticos envolvidos por membrana, os quais são rapidamente fagocitados por células vizinhas, sem causar inflamação. Na necrose, as células geralmente incham, a membrana plasmática rompe liberando seus conteúdos citosólicos no espaço extracelular, causando inflamação no tecido. Apoptose envolve células individuais cercadas por células saudáveis, enquanto necrose envolve grupos de células (WILLIE *et al.*, 1980).

Estímulos patológicos resultam em necrose, ao passo que estímulos fisiológicos resultam em apoptose, embora injúria branda possa resultar em apoptose (GERSCHENSON & ROTELLO, 1992).

Morte celular por apoptose, ao contrário da morte por necrose, protege o organismo eliminando células com danos no DNA ou com alterações patológicas, que poderiam interferir na homeostasia tecidual ou levar a transformação neoplásica (WILLIAMS, 1991).

Morfologicamente, os eventos nucleares de apoptose iniciam com o colapso da cromatina contra a periferia nuclear (WYLLIE *et al.*, 1980). O envelope nuclear permanece intacto. A cromatina torna-se progressivamente mais condensada adotando uma ou várias morfologias características: o núcleo inteiro condensa-se em um único corpo denso; a cromatina brota em pequenos corpos que lembram um cacho de uvas, sendo que cada “uva” encontra-se circundada pelo envelope nuclear; a cromatina adota a forma de meia-lua condensada contra um dos lados do núcleo. Em qualquer um destes padrões, o nível de condensação é dramático (EARNSHAW, 1995a).

Bioquimicamente, a apoptose é caracterizada pela clivagem da dupla fita de DNA nas regiões *linker*, entre os nucleossomos. Fragmentos nucleossômicos e oligonucleossômicos, com 180-200 pares de base e seus múltiplos, são reconhecidos pelo aspecto padrão em escada, nas eletroforeses em gel de agarose (WYLLIE *et al.*, 1980; ARENDS *et al.*, 1990). Sistemas *cell-free* estão auxiliando a revelar mecanismos bioquímicos da apoptose (EARNSHAW, 1995b). A indução do



programa apoptótico, nesses sistemas, requerem ATP e mitocôndria (LIU *et al.*, 1996).

Apoptose ocorre em quatro fases: 1. indiciamento (sinalização para morte); 2. julgamento (influencia o que poderá vir); 3. execução (comprometimento e processo de morte); 4. funeral (“empacotamento” da célula morta) (Annual meeting of the american association for cancer research, 1998).

Vários genes estão relacionados com a morte celular programada. Estudos genéticos com *Caenorhabditis elegans* evidenciam este programa intrínseco de morte, onde os genes *ced-3* e *ced-4* induzem à morte e o gene *ced-9* reprime o programa de morte. Em mamíferos, o gene que codifica a enzima convertora de interleucina 1 $\beta$  (ICE) é homólogo ao *ced-3* do Nematóide (YUAN *et al.*, 1993), enquanto *bcl-2* é homólogo ao *ced-9* (HENGARTNER & HORVITZ, 1994) e a proteína humana Apaf-1 (Apoptosis activating factors) assemelha-se a proteína CED-4 (ZOU *et al.*, 1997). A descoberta de que o gene *bcl-2* de células de mamíferos pode realizar a mesma função do gene *ced-9* em células do verme Nematóide demonstra que o mecanismo básico de apoptose foi altamente conservado na evolução (VAUX, 1997). Vários experimentos demonstram que o gene supressor de tumor p53, presente em mais da metade dos cânceres humanos, tem um papel importante no disparo da apoptose (LEVINE, 1997).

Morte celular programada refere-se a situações nas quais as células são programadas a morrer em um tempo determinado, seguindo o processo chamado apoptose (ALBERTS *et al.*, 1994). Vários autores descreveram sua ocorrência no *turnover* celular em tecidos saudáveis, embriogênese, metamorfose, atrofia de tecidos endócrino-dependentes, hiperplasia e neoplasia (WYLLIE *et al.*, 1980). Apoptose tem um importante papel durante o desenvolvimento, homeostase e em muitas doenças como câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida e desordens neurodegenerativas (STELLER, 1995).

Apoptose normalmente envolve processos nucleares. O programa de morte, entretanto, parece estar envolvido também com células diferenciadas especializadas, como as células sangüíneas vermelhas anucleadas de mamíferos, que perdem seus núcleos e outras organelas no processo de diferenciação terminal, formando os reticulócitos e eritrócitos, que continuam vivendo e metabolizando. Esses processos

de diferenciação podem ser formas modificadas de morte celular programada (JACOBSON *et al.*, 1997). Alterações celulares ocorridas durante a apoptose, como a translocação de fosfatidilserina da camada lipídica interna para o lado externo da membrana plasmática pode preceder as alterações nucleares e ser detectada por imunocitoquímica, como descrito em prospectos da firma Boehringer Mannheim e Clontech Laboratories, Inc.

Proliferação e apoptose são eventos inversos, porém coordenados que regulam o desenvolvimento e crescimento dos organismos multicelulares (GERSCHENSON & ROTELLO, 1992).

## 2. OBJETIVOS

A presente investigação tem por objetivo detectar e caracterizar fenômenos de morte celular programada em eritrócitos nucleados de frango, procurando-se estabelecer correlação com outros tipos de dados citoquímicos já disponíveis, como os de concentração crítica de eletrólitos (FALCO *et al.*, 1998).

Dada também a disponibilidade de material de outras espécies animais nas quais os eritrócitos são igualmente nucleados, buscou-se estender as observações às mesmas, para efeitos comparativos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Material**

Foi coletado sangue de frangos (Hubbard), pombos (*Columba livia*) e rãs (*Rana catesbeiana*). Os frangos foram fornecidos pelo Centro de Extensão e Pesquisa Agronômica (CEPAGRO) e os pombos e rãs pelo Biotério da Universidade de Passo Fundo/RS.

O sangue dos frangos foi obtido imediatamente após decapitação dos mesmos. O sangue dos pombos foi obtido por punção venosa na asa. O sangue das rãs foi obtido por decapitação após dessensibilização por secção da medula espinhal.

### **3.2. Métodos**

#### **3.2.1. Obtenção dos Preparados**

Na coleta de sangue foram utilizados três diferentes tipos de anticoagulantes:

1. salina a 0,9% - EDTA 0,24 M (2 ml);
2. citrato de sódio a 10% (1 ml) (GREENAWAY & MURRAY, 1971);
3. heparina a 1% (200 µl) (VILLELA *et al.*, 1973),

todos para 10 ml de sangue coletado.

Foram também preparados alguns esfregaços sem a utilização de anticoagulantes.

Foram preparados esfregaços de sangue fixados em etanol-ácido acético glacial (3:1, v/v) durante 1 min e em seguida lavados em etanol 70% durante 5 min e secados no ar.

### **3.2.2. Citoquímica e Imunocitoquímica**

Os preparados foram submetidos aos seguintes testes:

**3.2.2.1. Reação de Feulgen**, específica para DNA, que salienta os graus de alta condensação cromatínica e morfologia típicas de núcleos apoptóticos (MELLO, 1997; VIDAL, 1997).

Os esfregaços foram hidrolisados pelo HCl 4N por 1 hora e 30 min, a 25 °C. Depois de lavados com HCl 0,1N refrigerado, foram imersos no Reativo de Schiff segundo Lillie (MELLO & VIDAL, 1980) por 40 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. Os esfregaços foram lavados em água sulfurosa (1 parte de HCl 1N - 1 parte de metassulfito de sódio a 10% - 18 partes de água destilada), 3 banhos de 5 minutos cada. Após lavagem em água destilada, os esfregaços foram desidratados em série alcoólica, diafanizados em xilol e montados em Bálsamo do Canadá.

**3.2.2.2. Coloração pelo Azul de Toluidina a pH 4,0** segundo Vidal (MELLO & VIDAL, 1980).

Após umedecidos em água destilada, os esfregaços foram corados com Azul de Toluidina a 0,025% em tampão Mc Ilvaine pH 4,0 durante 20 minutos em temperatura ambiente, lavados 3 vezes em água destilada, secados ao ar, diafanizados em xilol (Merck) e montados em Bálsamo do Canadá.

### **3.2.2.3. Método de Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) para apoptose, conforme proposta de VIDAL e colaboradores (1996).**

Depois de corados pelo Azul de Toluidina a 0,025% em tampão Mc Ilvaine pH 4,0 durante 20 minutos em temperatura ambiente, os esfregaços foram mergulhados em solução de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) a 0,05 M, por 15 minutos. A seguir foram lavados 3 vezes em água destilada, secados ao ar, diafanizados em xilol (Merck) e montados em Bálsamo do Canadá.

### **3.2.2.4. Método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) (Boehringer Mannheim), que evidencia padrão de fragmentação internucleossômica, marcando as terminações 3' hidroxila do DNA *in situ*.**

Princípio do teste:

A clivagem do DNA genômico durante a apoptose pode produzir dupla fita, fragmentos de DNA de baixo peso molecular (mono e oligonucleossomos) bem como fragmentos de fita única (*nicks*) em DNA de alto peso molecular. Estes fragmentos de fita de DNA podem ser identificados por marcação das terminações 3'-OH livres com nucleotídeos modificados em uma reação enzimática. No kit utilizado, a desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) catalisa a polimerização de nucleotídeos nas extremidades livres 3'-OH do DNA, de uma maneira independente de padrão, marcando os fragmentos da fita de DNA. A incorporação de fluoresceína

é detectada por anticorpos anti-fluoresceína, fragmentos Fad de ovelha, conjugado com peroxidase *horse-radish* (POD). Após reação com o substrato, as células coradas podem ser analisadas em microscópio óptico.

Procedimento técnico (TUNEL):

1. Foram colocados 50  $\mu$ l de Proteinase K (Sigma) (20  $\mu$ g/ml em PBS) nos esfregaços e cobriu-se com lâmina de plástico, durante 15 minutos, para que esta enzima retirasse as proteínas, liberando o DNA fragmentado nos sítios específicos.
2. Após lavagem com PBS (solução salina tamponada), foi colocado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (Merck) em metanol, durante 15 minutos a fim de inativar as peroxidases endógenas. A seguir lavou-se com PBS e retirou-se o excesso.
3. Adicionaram-se 50  $\mu$ l da mistura para a reação de TUNEL, preparada imediatamente antes do uso, através da adição de 50  $\mu$ l de solução de enzima desoxinucleotidil transferase terminal de timo de bezerro em 450  $\mu$ l de solução *label* (mistura de nucleotídeos em reação tampão). Cobriu-se com lâmina de plástico e incubou-se a 37 °C por 1 hora em ambiente úmido.
4. Após 3 lavagens com PBS e retirada do excesso, adicionaram-se 50  $\mu$ l de *Converter-POD* (anticorpo anti-fluoresceína conjugado com peroxidase), cobriu-se os esfregaços com lâmina de plástico, incubando 30 minutos a 37 °C em câmara úmida. A seguir lavou-se 3 vezes com PBS e retirou-se o excesso.
5. Adicionaram-se 50  $\mu$ l de solução substrato DAB (50 mg de diaminobenzidina diluídos em 50 ml de PBS e 100  $\mu$ l de peróxido de hidrogênio 30%, preparada imediatamente antes do uso), incubando-se por 2-5 minutos à temperatura ambiente. Observou-se o aparecimento de coloração marrom nos esfregaços.
6. Após lavagem com água destilada e retirada do excesso, os esfregaços foram contracorados com Metil Green (verde de metila 0,5% em tampão acetato de sódio 0,1 M) durante alguns segundos, lavados com água destilada, e depois de retirado o excesso, observou-se ao microscópio óptico o aparecimento da coloração verde.

7. A seguir os esfregaços foram lavados 3 vezes em água destilada, desidratados em série alcoólica, diafanizados em xilol durante 10 minutos e montados com Bálsamo do Canadá.

### **3.2.2.5. Reação Controle para Imunocitoquímica**

Devido às altas concentrações de peroxidases endógenas em eritrócitos, os esfregaços sangüíneos nos diferentes anticoagulantes utilizados, foram submetidos a testes prévios de bloqueio das peroxidases endógenas, com concentrações de  $H_2O_2$  3%, 6% e 9% em metanol. Em seguida, utilizou-se a solução de peroxidase HRP (2 mg de peroxidase dissolvidos em 50 ml de tampão fosfato 0,06 M, pH 7,2) em solução DAB (50 mg de 3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorato dissolvidos em 50 ml de tampão fosfato 0,06 M, pH 7,2 mais 0,5 ml de  $H_2O_2$  0,5%) para avaliação da eficiência do bloqueio.

Como resultado obtivemos o bloqueio das peroxidases endógenas a partir da concentração de  $H_2O_2$  3% em metanol.

### **3.2.3. Análise e Documentação Fotográfica**

As lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss (Standard). Para a documentação fotográfica, utilizou-se fotomicroscópio Zeiss Axiophot II.



### **3.2.4. Análise Estatística**

O teste de qui-quadrado (1993 GraphPad InStat tm) foi aplicado com a finalidade de se testar a hipótese de independência, além de se estudar a relação entre as duas variáveis de classificação.

## 4. RESULTADOS

Os dados de morfologia, citoquímica e imunocitoquímica acham-se documentados em 8 pranchas de micrografias .

Os dados quantitativos estão documentados em tabela.

### 4.1. Observações Qualitativas

As FIGURAS 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram alguns aspectos morfológicos, citoquímicos e imunocitoquímicos de células em processo de morte celular, admitida como programada, nos diferentes materiais e em algumas diferentes situações de tratamento com substâncias anticoagulantes.

Nos preparados das várias espécies submetidos à reação de Feulgen os núcleos de eritrócitos em processo de morte celular foram mais dificilmente detectados (FIGURAS 1, 5a-c) à exceção de eritrócitos de rã (FIGURA 7a). A avaliação foi prejudicada pelo próprio estado de compactação cromatínica dos eritrócitos e pela presença de núcleos de trombócitos que em aves se assemelham morfológicamente a uma imagem apoptótica (HOFFMANN & VÖLKER, 1969) (FIGURAS 1a, c; 5a, b).

Notou-se também que o tipo de anticoagulante pode afetar a imagem obtida, como é o caso do citrato que, possivelmente, por remoção de proteínas nucleares, tenha contribuído para que a cromatina se relocasse no núcleo. Os núcleos dos eritrócitos de frango foram os mais afetados, exibindo formas mais arredondadas e deslocamento da cromatina para a periferia (FIGURA 1b), enquanto que os de pombos e rãs apresentaram menores alterações cromatínicas (FIGURA 5b).

Nos esfregaços coletados com EDTA e submetidos à reação de Feulgen, a cromatina encontra-se mais uniformemente distribuída, apresentando vários estágios

de compactação, o que torna a observação de células suspeitas de apoptose mais facilmente detectáveis em relação à heparina e ao citrato (FIGURAS 1, 5a-c, 7a).

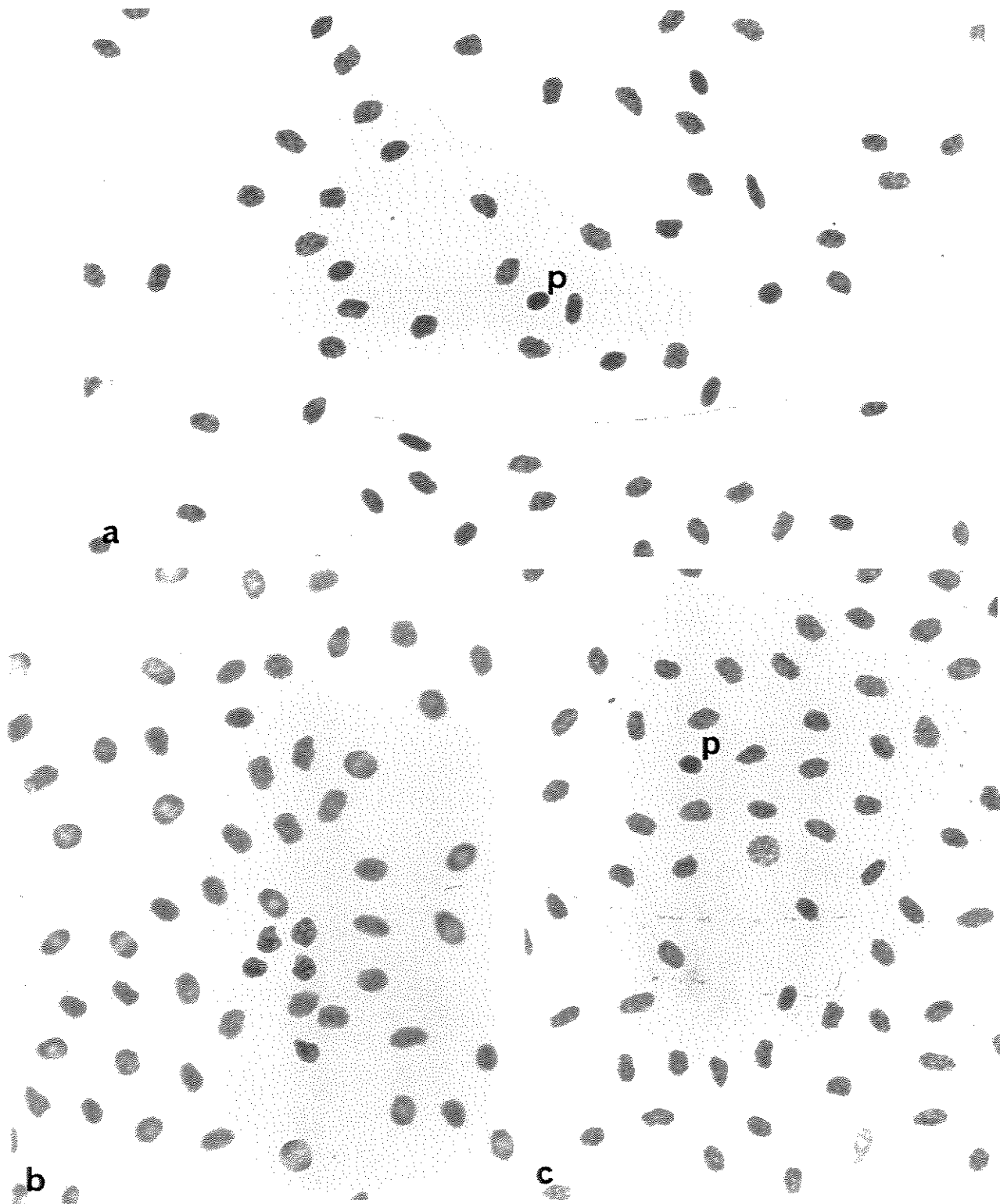
Com heparina, os núcleos dos eritrócitos parecem apresentar cromatina mais frouxa em relação ao EDTA (FIGURAS 1a, c; 5a, c).

A FIGURA 5e exibe aspectos de coloração com azul de toluidina a pH 4,0 na ausência de ions  $Mg^{2+}$  em núcleos de eritrócitos de pombo, servindo como controle para o método de CEC. Núcleos de trombócitos podem ser observados nessa figura.

Quanto aos preparados submetidos ao método de CEC, foi muito difícil discriminar eritrócitos em apoptose. Os núcleos dos eritrócitos apresentam-se azulados após coloração com AT em tampão Mc Ilvaine a pH 4,0 e adição de ions  $Mg^{2+}$  (FIGURAS 2; 5d, f, g; 7b, c). As FIGURAS 2a e 7c exibem leucócitos com metacromasia. Trombócitos destacam-se na FIGURA 5f.

Por outro lado, com o método imunocitoquímico, as imagens de morte celular foram perfeitamente identificáveis, podendo-se inclusive visualizar-se passos diferentes do processo (FIGURAS 4, 6 e 8). Os controles revelaram que a reação não foi devida a peroxidases endógenas (FIGURA 3).

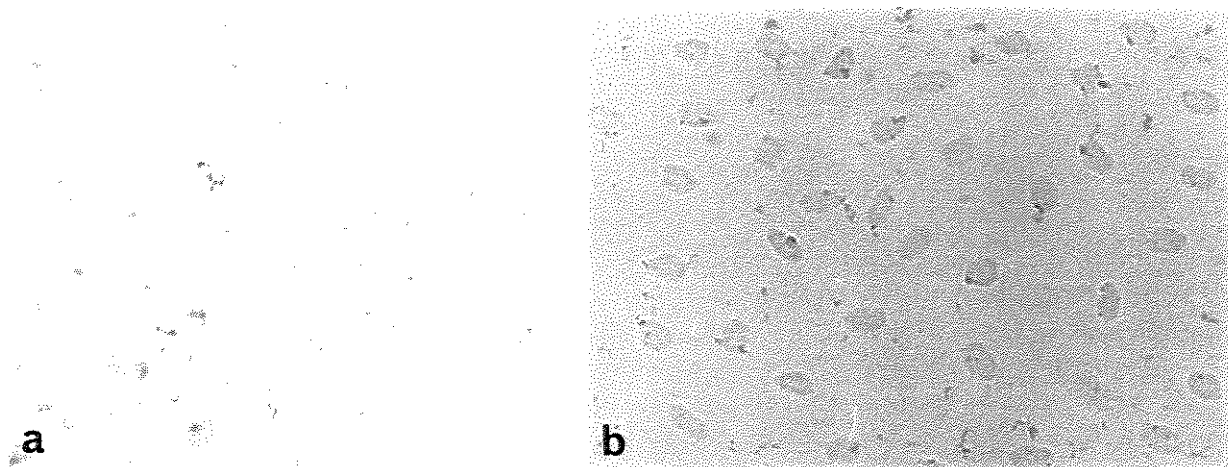
Alterações relativas aos diferentes anticoagulantes também podem ser observadas nos esfregaços submetidos ao método de TUNEL, especialmente nos núcleos de eritrócitos de frango. Quando coletado com o anticoagulante EDTA, apresentam sua forma normal, oval (FIGURAS 4a, b); com citrato e sem tratamento anticoagulante exibem forma arredondada (FIGURA 4c, e); com heparina mostram formas variadas e aumento de volume (FIGURA 4d).



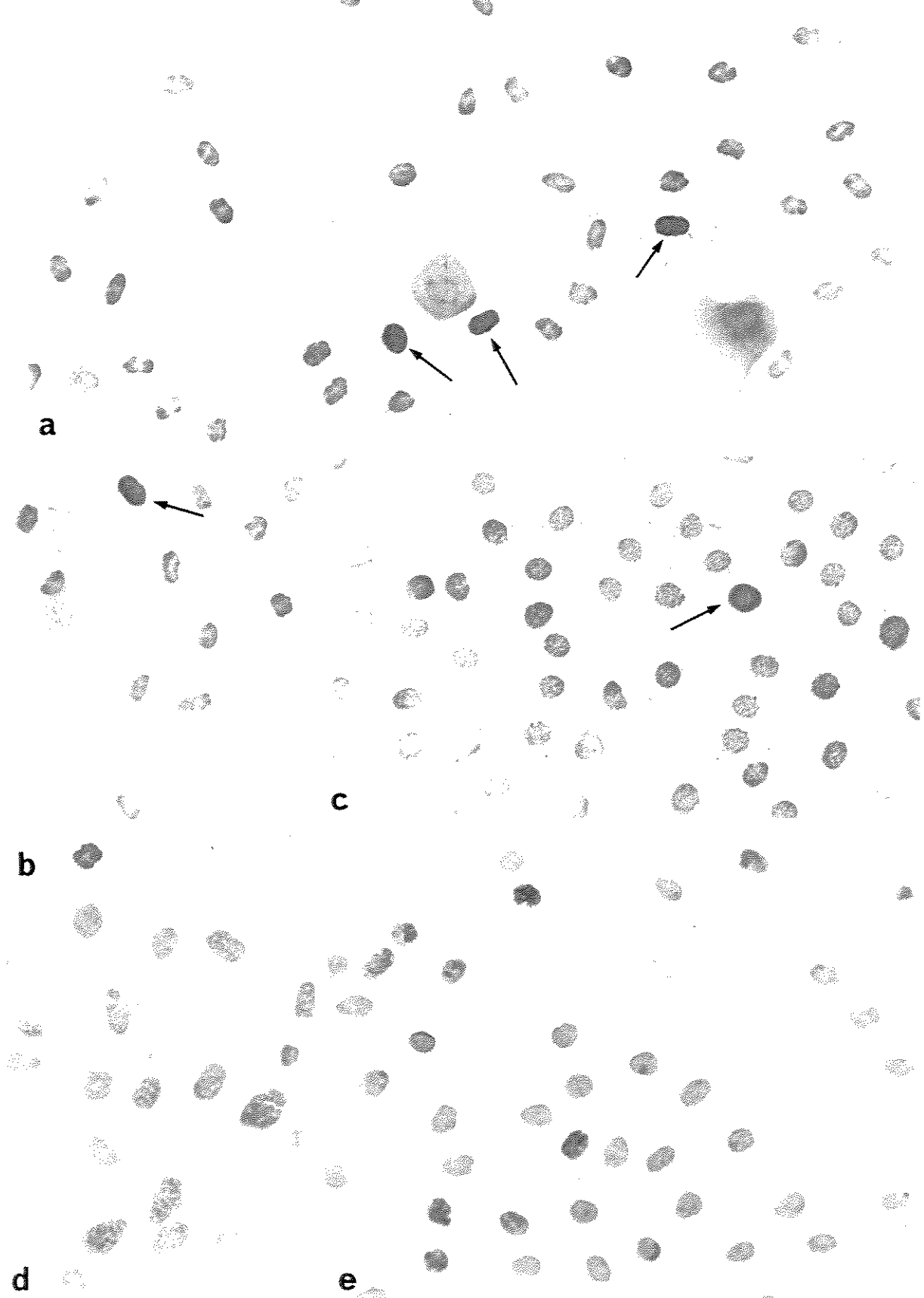
**FIGURA 1.** Eritrócitos de frango submetidos à reação de Feulgen. Anticoagulantes: EDTA (a), citrato (b), heparina (c). x 1075. p, trombócitos.



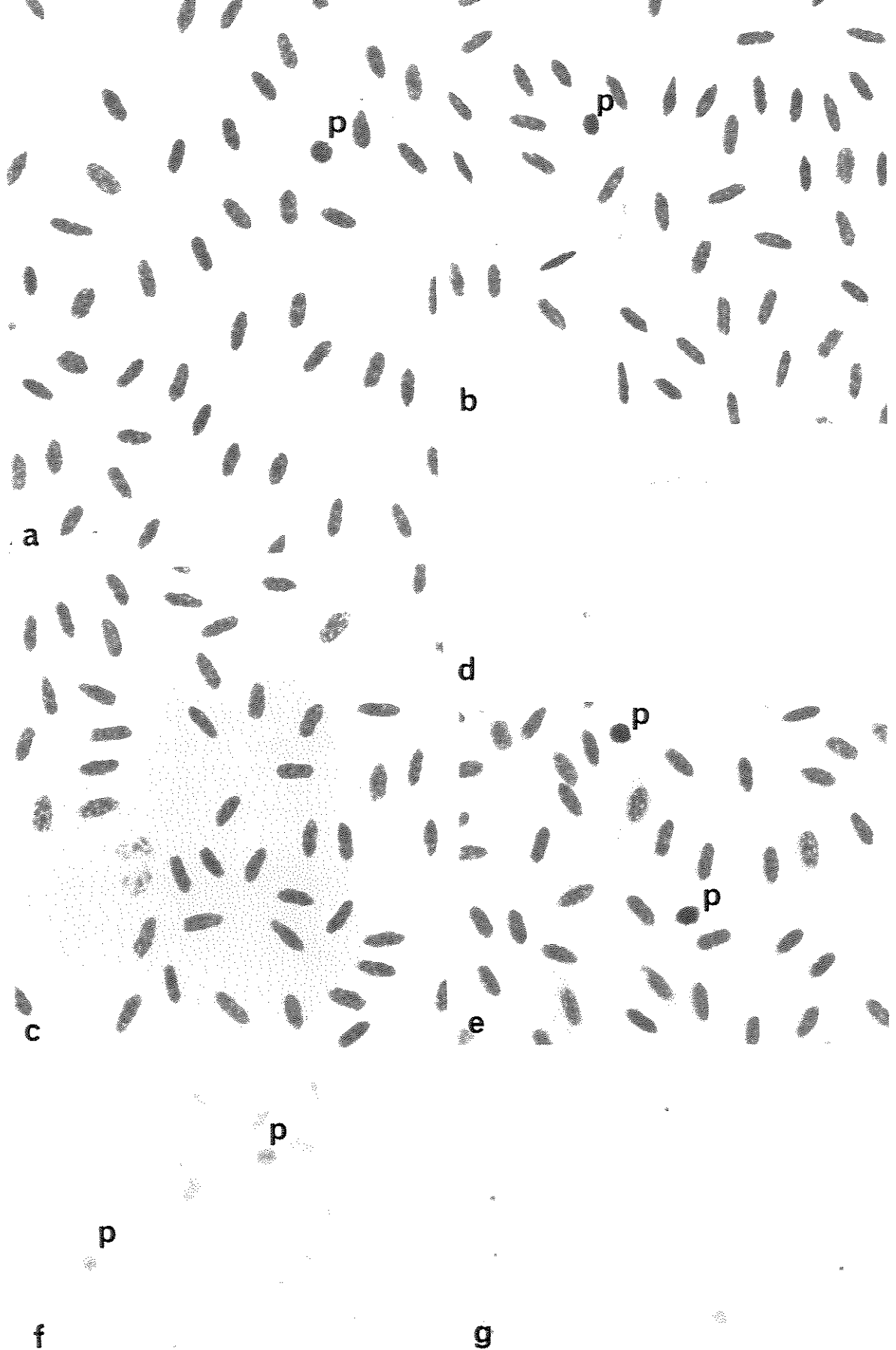
**FIGURA 2.** Eritrócitos de frango submetidos ao método de CEC. Anticoagulantes: EDTA (a), citrato (b). x 1075. G, leucócitos.



**FIGURA 3.** Eritrócitos de frango submetidos à reação controle para imunocitoquímica, tratados com HRP-DAB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol (a), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9% em metanol (b). Anticoagulante: EDTA. x 1125.

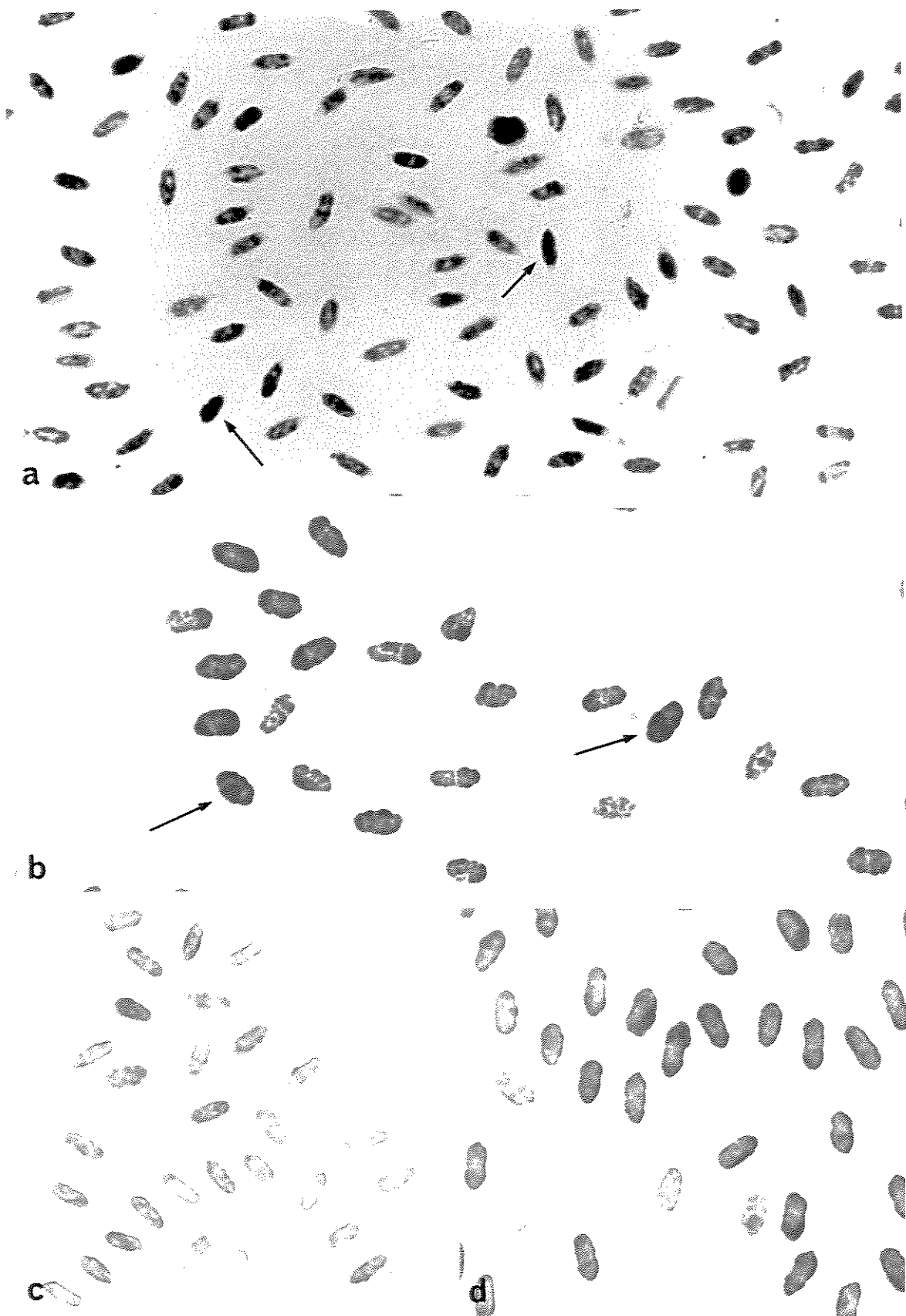


**FIGURA 4.** Eritrócitos de frango submetidos ao método de TUNEL. Anticoagulantes: EDTA (a, b), heparina (d), citrato (e), sem tratamento anticoagulante (c). a, b, c, x 1075; d, e, x 1250. As setas indicam resposta mais intensa ao método.

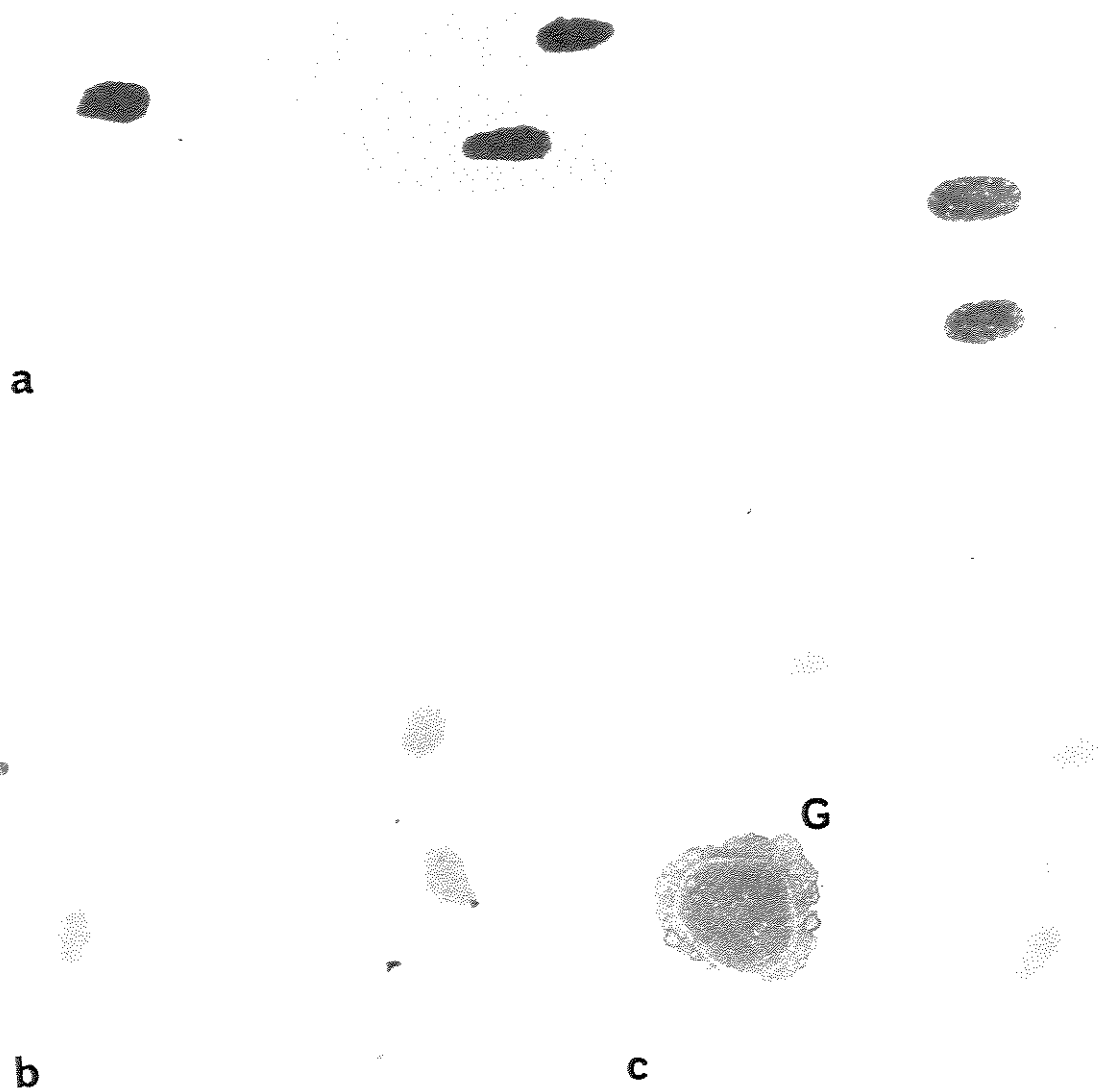


**FIGURA 5.** Eritrócitos de pombo submetidos à reação de Feulgen (a-c), ao método de CEC (d, f, g) e à coloração com azul de toluidina a pH 4,0 (e). Anticoagulantes: EDTA (a, d, e), citrato (b, f), heparina (c, g). x 1075. p, trombócitos.

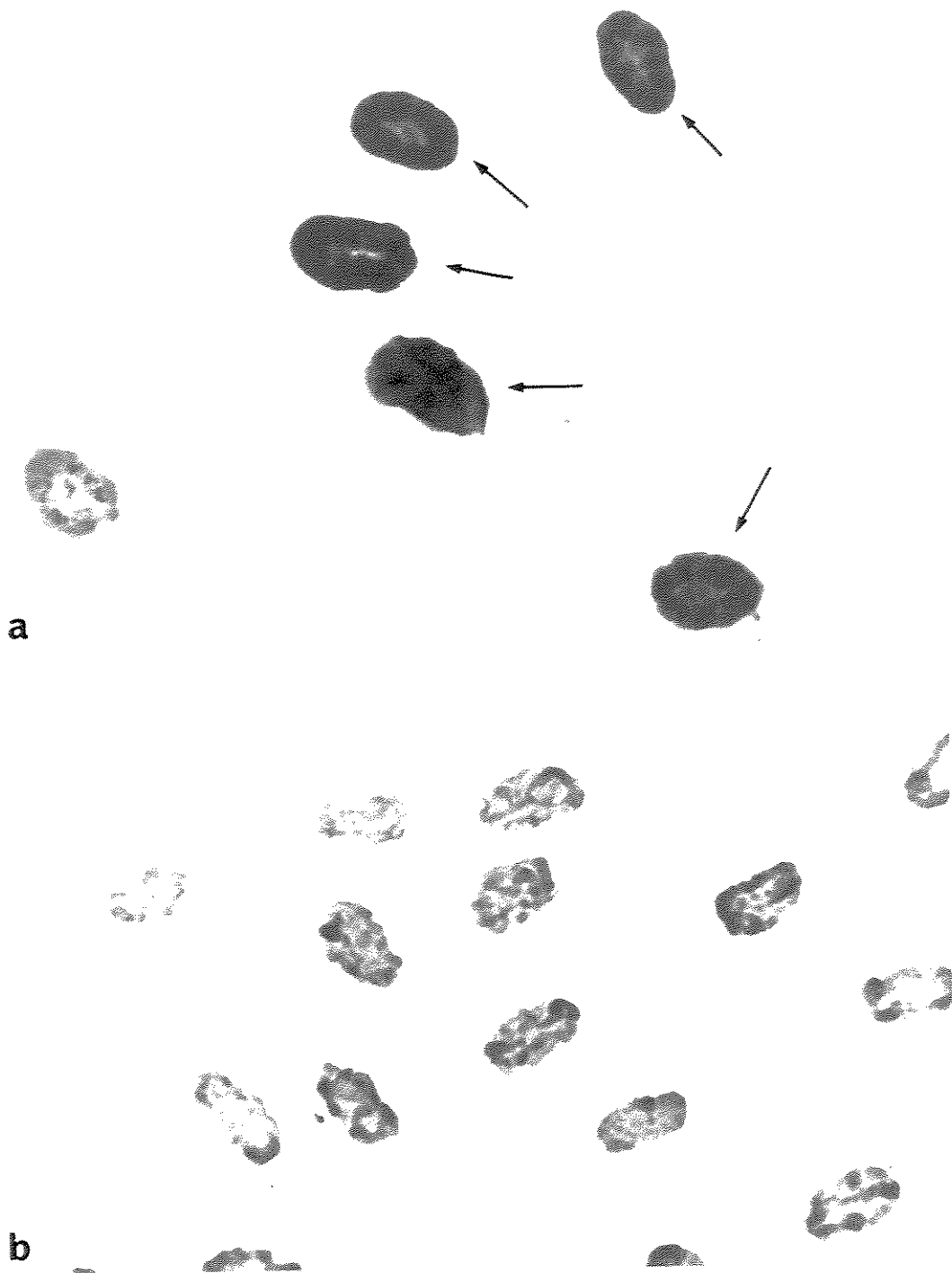




**FIGURA 6.** Eritrócitos de pombo submetidos ao método de TUNEL. Anticoagulantes: EDTA (a, b), citrato (c), heparina (d). x 1075. As setas indicam respostas mais intensa ao método.



**FIGURA 7.** Eritrócitos de rã submetidos à reação de Feulgen (a) e ao método de CEC (b, c). Material tratado com anticoagulantes: EDTA (a), citrato (b), heparina (c). a, x 1200; b, c, x 1125. G, leucócito.



**FIGURA 8.** Eritrócitos de rã submetidos ao método de TUNEL. Anticoagulantes: EDTA (a), heparina (b). x 1250. As setas indicam resposta mais intensa ao método.

## 4.2. Observações Quantitativas

Foram contadas 2.000 células, ao acaso, para cada espécie e para cada condição de tratamento com anticoagulante.

A TABELA 1 mostra uma alta percentagem de morte celular programada com graus variados de resposta positiva ao método imunocitoquímico.

**TABELA 1.** Frequência relativa de resposta ao método imunocitoquímico de TUNEL em eritrócitos nucleados (n, 2000).

Eritrócitos	Anticoagulante	Respostas				
		+++	++	+	Subtotal	-
Frango	EDTA	5	35	56	96	4
	Citrato	3	24	67	94	6
	Heparina	3	43	50	96	4
	Ausente	2	37	58	97	3
Pombo	EDTA	4	38	55	97	3
	Citrato	2	27	67	96	4
	Heparina	4	39	54	97	3
Rã	EDTA	59	25	12	96	4
	Citrato	26	40	23	89	11
	Heparina	51	36	10	97	3

Resposta positiva: +++, intensa; ++, intermediária; +, fraca; resposta negativa: -

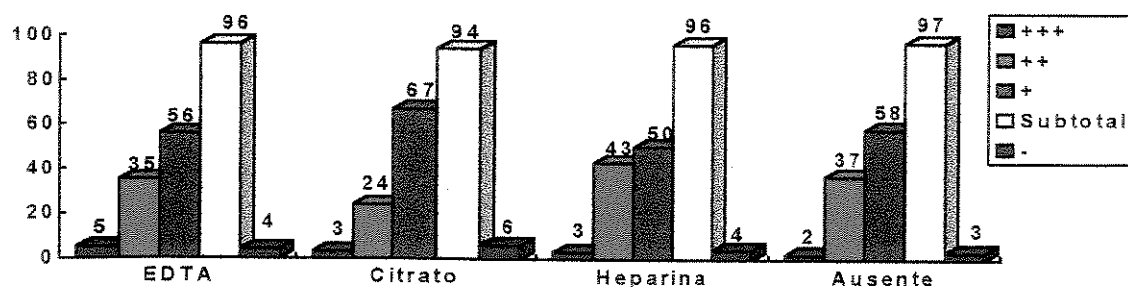


Para facilitar a visualização dos percentuais obtidos na TABELA 1, utilizou-se a representação gráfica destes dados (FIGURAS 9-14).

As FIGURAS 9, 10 e 11 registram a variação de resposta ao método imunocitoquímico de TUNEL em núcleos de eritrócitos de frango, pombo e rã respectivamente, nos diferentes anticoagulantes. Observa-se uma reação positiva para a maioria das células (> 90%).

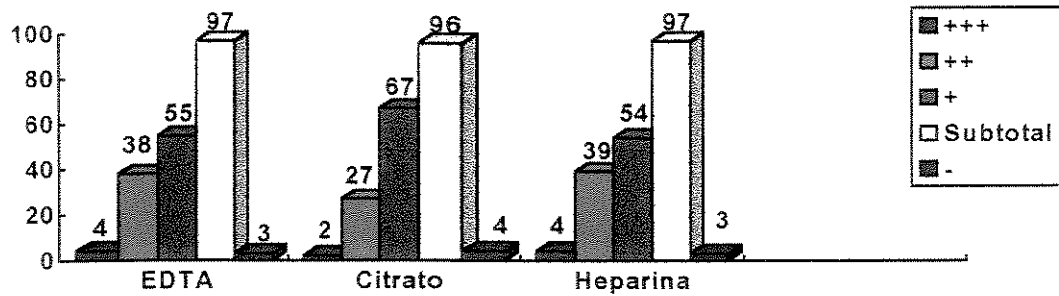
As FIGURAS 12, 13 e 14 registram a intensidade de resposta ao método de TUNEL nos diferentes animais, com um anticoagulante em particular. Observa-se que os núcleos dos eritrócitos de aves apresentaram resultados semelhantes entre si, porém distintos dos de rã que respondem mais intensamente ao método.

**FIGURA 9.** Intensidade (%) de resposta ao método de TUNEL em eritrócitos de frango.



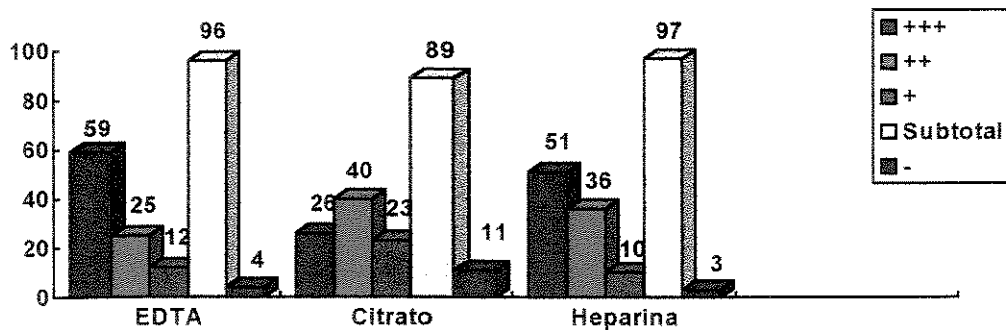
Resposta positiva: +++, intensa; ++, intermediária; +, fraca; resposta negativa: -

**FIGURA 10.** Intensidade (%) de resposta ao método de TUNEL em eritrócitos de pombo.



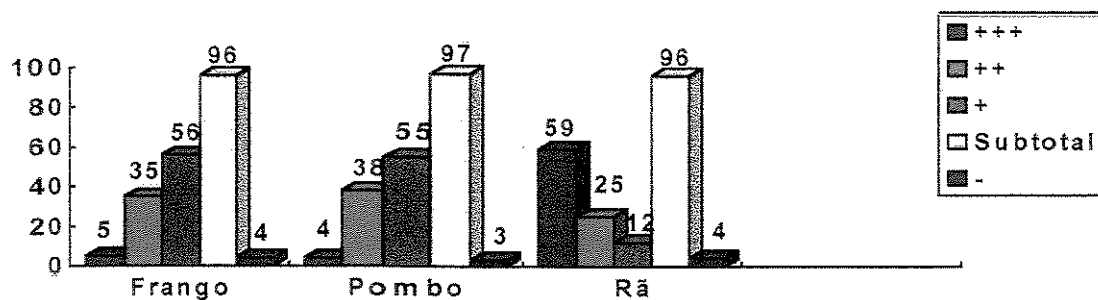
Resposta positiva: +++, intensa; ++, intermediária; +, fraca; resposta negativa: -

**FIGURA 11.** Intensidade (%) de resposta ao método de TUNEL em eritrócitos de rã.



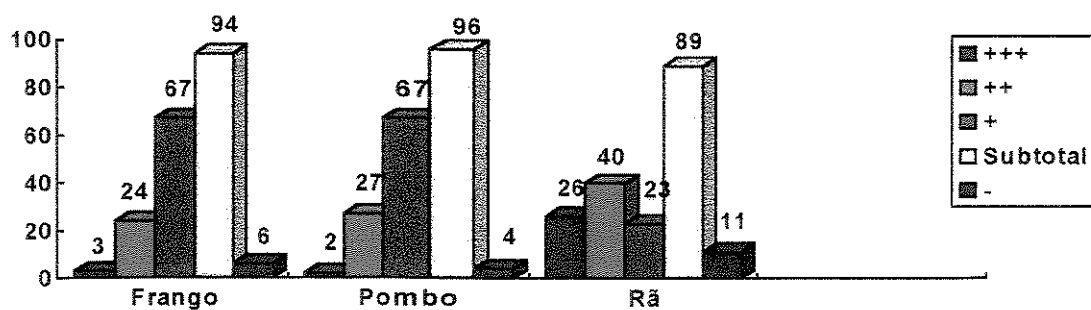
Resposta positiva: +++, intensa; ++, intermediária; +, fraca; resposta negativa: -

**FIGURA 12.** Intensidade (%) de resposta ao método de TUNEL em eritrócitos coletados com anticoagulante EDTA.



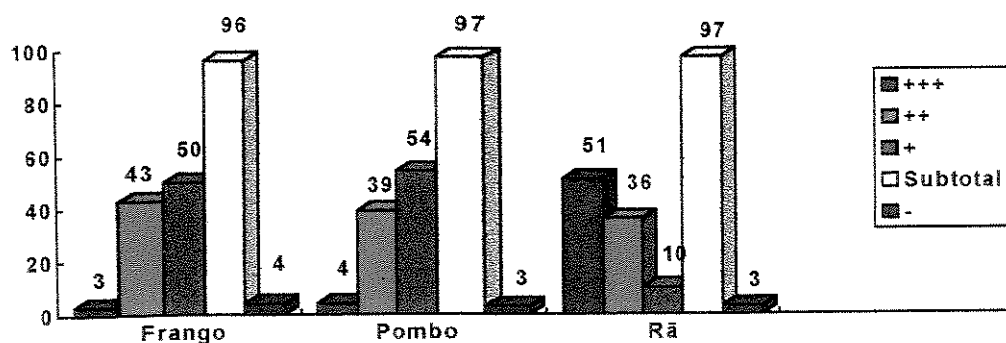
Resposta positiva: +++, intensa; ++, intermediária; +, fraca; resposta negativa: -

**FIGURA 13.** Intensidade (%) de resposta ao método de TUNEL em eritrócitos coletados com anticoagulante citrato.



Resposta positiva: +++, intensa; ++, intermediária; +, fraca; resposta negativa: -

**FIGURA 14.** Intensidade (%) de resposta ao método de TUNEL em eritrócitos coletados com anticoagulante heparina.



Resposta positiva: +++, intensa; ++, intermediária; +, fraca; resposta negativa: -

### 4. 3. Análise estatística

Os dados quantitativos que constam na TABELA 1 foram analisados estatisticamente através do teste de qui-quadrado (TABELAS 2-8).

Na TABELA 2, o teste de qui-quadrado demonstrou que as variáveis intensidade de resposta ao método de TUNEL e anticoagulantes estão significativamente associadas, não são independentes entre si, ou seja, as intensidades são mais caracterizadas por um particular anticoagulante, tanto em núcleos de eritrócitos de frango, pombo ou rã.

A TABELA 3 mostra que a intensidade de resposta ao método de TUNEL, em núcleos de eritrócitos de frango, pombo e rã está significativamente associada



com os diversos animais analisados, nos três anticoagulantes utilizados. As intensidades de respostas, portanto, são mais caracterizadas por um particular animal.

Comparando-se estatisticamente os animais, dois a dois, em relação à intensidade de resposta ao método de TUNEL, com o mesmo anticoagulante, o teste de qui-quadrado demonstrou que as variáveis estão significativamente associadas. Os núcleos de eritrócitos de frango, pombo e rã apresentam reações particulares em relação ao outro animal. Existe dependência entre animal e reação (TABELA 4).

Na TABELA 5 observa-se que existe associação significativa entre as respostas positiva *versus* negativa ao método de TUNEL e os diversos anticoagulantes, para os três animais analisados.

A TABELA 6 mostra que existe associação significativa entre animais e reação (positiva *versus* negativa) com o anticoagulante citrato, porém não há associação significativa com EDTA e heparina.

Quando se comparam estatisticamente os animais, aos pares, em relação a resposta global (positiva *versus* negativa) ao método de TUNEL, usando-se o mesmo anticoagulante, o teste de qui-quadrado demonstrou que entre: (1) pombo-rã (EDTA), frango-pombo (citrato), frango-rã (citrato) e pombo-rã (citrato) existe uma associação significativa; (2) frango-pombo (EDTA), frango-rã (EDTA), frango-pombo (heparina), frango-rã (heparina) e pombo-rã (heparina) não há uma associação significativa, ou seja, não existe dependência entre animais e reação. Os núcleos destes eritrócitos não apresentam reações particulares em relação ao outro animal quanto à resposta positiva *versus* negativa ao método de TUNEL, com estes anticoagulantes (TABELA 7).

Na TABELA 8, o teste de qui-quadrado, para comparação entre as respostas mais intensa (+++) ao método imunocitoquímico e demais respostas (++, +, ausente) nos diversos animais (aos pares), mostra que as variáveis estão significativamente associadas, exceto para frango-pombo (EDTA e heparina) onde a associação foi não significativa. Deste modo, com EDTA e heparina, a resposta mais intensa ao método de TUNEL (+++) foi semelhante em aves, quando analisada pelo teste de qui-quadrado. Rã diferencia das aves, com os três anticoagulantes.

**TABELA 2.** Teste de qui-quadrado, para comparação entre intensidade de resposta ao método de TUNEL e os diversos anticoagulantes utilizados.

Animais	P	Associação
Frango	< 0,0001	S
Pombo	< 0,0001	S
Rã	< 0,0001	S

Significativa, S; n, 2000

**TABELA 3.** Teste de qui-quadrado, para comparação entre intensidade de resposta ao método de TUNEL e os diversos animais (eritrócitos de frango, pombo e rã).

Anticoagulante	P	Associação
EDTA	< 0,0001	S
Citrato	< 0,0001	S
Heparina	< 0,0001	S

Significativa, S; n, 2000

**TABELA 4.** Teste de qui-quadrado, para comparação entre intensidade de resposta ao método de TUNEL e os diversos animais (2 a 2).

Animais	P	Associação
Frango e pombo – E	< 0,0352	S
Frango e rã – E	< 0,0001	S
Pombo e rã – E	< 0,0001	S
Frango e pombo – C	< 0,0034	S
Frango e rã – C	< 0,0001	S
Pombo e rã – C	< 0,0001	S
Frango e pombo - H	< 0,0234	S
Frango e rã – H	< 0,0001	S
Pombo e rã – H	< 0,0001	S

Anticoagulantes: EDTA, E; Citrato, C; Heparina, H

Significativa, S; n, 2000

**TABELA 5.** Teste de qui-quadrado, para comparação entre as respostas positiva *versus* negativa (TUNEL) e os diversos anticoagulantes.

Animais	P	Associação
Frango	< 0,0009	S
Pombo	< 0,0228	S
Rã	< 0,0001	S

Significativa, S; n, 2000

**TABELA 6.** Teste de qui-quadrado, para comparação entre as respostas positiva *versus* negativa (TUNEL) e os diversos animais (frango, pombo e rã).

Anticoagulante	P	Associação
EDTA	0,0941	NS
Citrato	< 0,0001	S
Heparina	0,2229	NS

Significativa, S; Não Significativa, NS; n, 2000

**TABELA 7.** Teste de qui-quadrado, para comparação entre as respostas positiva *versus* negativa (TUNEL) e os diversos animais (2 a 2).

Animais	P	Associação
Frango e pombo – E	0,0896	NS
Frango e rã – E	0,6943	NS
Pombo e rã – E	< 0,0369	S
Frango e pombo – C	< 0,0111	S
Frango e rã – C	< 0,0001	S
Pombo e rã – C	< 0,0001	S
Frango e pombo – H	0,0832	NS
Frango e rã – H	0,4022	NS
Pombo e rã – H	0,3690	NS

Anticoagulantes: EDTA, E; Citrato, C; Heparina, H

Significativa, S; Não Significativa, NS; n, 2000

**TABELA 8.** Teste de qui-quadrado, para comparação entre as respostas mais intensa (+++) ao método de TUNEL e demais respostas (++, +, ausente), nos diversos animais (2 a 2).

Animais	P	Associação
Frango e pombo – E	0,0864	NS
Frango e rã – E	< 0,0001	S
Pombo e rã – E	< 0,0001	S
Frango e pombo – C	< 0,0388	S
Frango e rã – C	< 0,0001	S
Pombo e rã – C	< 0,0001	S
Frango e pombo - H	0,2104	NS
Frango e rã – H	< 0,0001	S
Pombo e rã – H	< 0,0001	S

Anticoagulantes: EDTA, E; Citrato, C; Heparina, H

Significativa, S; Não Significativa, NS; n, 2000

## 5. DISCUSSÃO

As células eritrocíticas, ao atingir sua maturidade, encontram-se aptas a desempenhar suas funções específicas, sendo então enviadas à corrente sanguínea sob a denominação de eritrócitos. Durante a maturação, o volume da célula diminui, o citoplasma torna-se acidófilo devido ao aumento de hemoglobina e, nos mamíferos, a cromatina torna-se cada vez mais densa, o núcleo torna-se picnótico e é expulso da célula (ROSS *et al.*, 1993; GUYTON, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NELSON & DAVEY, 1995).

Por outro lado, nos eritrócitos de aves e anfíbios, o núcleo permanece na célula madura (HOFFMANN & VÖLKER, 1969; HODGES, 1974; STORER & USINGER, 1976; SWENSON, 1988; BANKS, 1992), e a condensação cromatínica continua aumentando na corrente circulatória destes animais, como podemos observar nos esfregaços submetidos à reação de Feulgen. Nos eritrócitos nucleados analisados, observamos uma gradual compactação da cromatina: os reticulócitos - eritrócitos recém liberados pela medula para a corrente sanguínea - apresentam cromatina mais frouxa, enquanto os eritrócitos senescentes exibem sua cromatina em estado máximo de compactação apresentando fenótipos nucleares hipercromáticos suspeitos de apoptose. Em rãs, estes processos de morte celular foram detectados com mais facilidade; em frangos e pombos, o EDTA parece ser o anticoagulante que permite, embora com alguma dificuldade, a detecção deste processo.

Com tratamento pelo método de CEC, a resposta dos eritrócitos nucleados foi homogênea, tornando-se imensurável.

Na análise dos esfregaços submetidos ao método imunocitoquímico de TUNEL, os eventos nucleares morfológicos de morte celular programada encontram-se bem evidenciados. A fragmentação do DNA internucleossomal, que ocorre no processo apoptótico, é identificada pela observação de células onde a cromatina ocupa a periferia nuclear contra o envelope nuclear intacto, e em outras onde a cromatina brota em forma de pequenos corpos semelhantes a “uvas”.

Aparentemente, o material coletado com EDTA apresentou melhor qualidade visual, em concordância com o fato de ser o anticoagulante mais usado na rotina hematológica para estudos morfológicos e para contagem de células sangüíneas (LIMA *et al.*, 1977; NELSON & MORRIS, 1995). A heparina mostrou-se intermediária pois, apesar de ser considerada um anticoagulante que não altera a morfologia dos leucócitos e glóbulos vermelhos (MOURA *et al.*, 1982), pode ligar-se a histonas modificando a organização dos complexos DNA-proteína (KITZIS *et al.*, 1976) e, a alta quantidade de histona H5, presente nos nucleossomos de eritrócitos de aves, também parece interferir no modo de ação da heparina (DOENECKE, 1984). Por outro lado, o citrato de sódio foi o anticoagulante que apresentou maiores alterações em núcleos dos eritrócitos, vindo de encontro ao fato de ser usado, na rotina laboratorial, para estudos de coagulação sangüínea e função plaquetária, e não morfológicos (MOURA *et al.*, 1982; NELSON & MORRIS, 1995). Os esfregaços coletados sem tratamento anticoagulante também apresentaram alterações morfológicas.

Os métodos citoquímicos utilizados para a avaliação do padrão cromatínico dos núcleos de eritrócitos e o método imunocitoquímico de TUNEL para detecção dos fragmentos terminais 3'OH do DNA levam ao padrão apoptótico de morte celular programada. Assim, os eritrócitos nucleados de aves (frango e pombo) e de anfíbio (rã) teriam seu programa de morte ativado ao serem liberados na circulação sangüínea, que perduraria por 30-40 dias para os eritrócitos de aves (HOFFMANN & VÖLKER, 1969; GÜRTLER *et al.*, 1987) e 24 dias para os de rã (BACA SARAVIA, 1961).

Estatisticamente, o teste de qui-quadrado revelou que tanto os anticoagulantes utilizados como os animais analisados estão significativamente associados quanto à intensidade de resposta ao método imunocitoquímico, que é mais caracterizada por um particular anticoagulante e/ou animal. Entretanto, quando se comparam as respostas mais intensa (+++) *versus* demais respostas (++, +, ausente), observa-se que os núcleos de eritrócitos de rã estão significativamente associados com os de aves (frango e pombo) nos três anticoagulantes; os de frango e pombo, estão significativamente associados com o anticoagulante citrato, e mostram independência com EDTA e heparina. Assim, estatisticamente, frango e pombo têm

resposta semelhante com estes dois anticoagulantes e o anfíbio se diferencia das aves.

Essa diferença percentual de resposta mais forte (+++) ao método imunocitoquímico, que nas aves encontra-se praticamente ausente, enquanto nas rãs encontra-se em torno de 50 %, pode estar associada ao tempo de vida mais curto destes eritrócitos em relação aos de aves (BACA SARAVIA, 1961; HOFFMANN & VÖLKER, 1969; GÜRTLER *et al.*, 1987) e a tipos diferentes de histona H5, que apresentam heterogeneidade e polimorfismo em eritrócitos nucleados de aves, anfíbios e peixes (GREENAWAY & MURRAY, 1971), e que fariam ocorrer diferentes complexos DNA-proteína. Com isso, o acesso do DNA à fragmentação por endonucleases talvez fosse diferente e da mesma forma a resposta ao método de TUNEL.

O alto percentual de morte celular programada revelada pelo método de TUNEL estaria de acordo com dados de CEC da cromatina detectados por FALCO e colaboradores (1998). Os graus variados de resposta positiva ao método imunocitoquímico indicariam diferentes etapas do processo de morte, que estaria envolvido com alterações químicas e de esteroarranjo dos complexos DNA-proteína e que poderiam afetar seus valores de CEC. Apesar das diferenças de temperatura corpórea e duração de vida média dos eritrócitos dos animais analisados, os resultados mostraram que a maioria da população celular (> 90 %) se encontrava em alguma fase ativa do processo de morte celular programada, o que se refletia em padrão variado de intensidade de marcação imunocitoquímica dos núcleos, sugerindo conservação do processo, pelo menos em aves e no anfíbio estudado.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. Differentiated cells and the maintenance of tissues. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3. ed. New York : Garland Publishing Inc., p. 1161-1175, 1994.
- ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (89. : 1998 : New Orleans). **Proc. An. Assoc. Cancer Res.** 39 : 174, 1998.
- ARENDS, M.J., MORRIS, R.G., WYLLIE, A.H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **Am. J. Pathol.**, v. 136, n. 3, p. 593-608, 1990.
- BACA SARAVIA, R. Comparacion entre la longevidad de los globulos rojos de sapos, en estado normal y en hibernacion. **Haematologica Latina (Milan)**, v. 6, p. 107-113, 1961.
- BANKS, W.J. Sangue. Hematopoese. In: **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo : Manole, p. 187-214, 1992.
- CLARK, D.J., THOMAS, J.O. Differences in the binding of H1 variants to DNA. Cooperativity and linker-length related ditribution. **Eur. J. Biochem.**, v. 178, p. 225-233, 1988.
- DOENECKE, D. Differential response of avian red blood cell nucleosomes to heparin. **Biochemistry International**, v. 9, n.1, p. 129-136, 1984.
- EARNSHAW, W.C. Nuclear changes in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 337-343, 1995a.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 6023 : referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 19p., 1989.

- EARNSHAW, W.C. Apoptosis: lessons from *in vitro* systems. **Trends in Cell Biology**, v. 5, p. 217-220, 1995b.
- FALCO, J.R.P., MELLO, M.L.S., MARIA, S.S., GRAZZIOTIN, N.A. Critical electrolyte concentration of chicken erythrocyte chromatin. Subm. à public., 1998.
- GERSCHENSON, L.E., ROTELLO, R. J. Apoptosis: a different type of cell death. **The FASEP Journal**, v. 6, 2450-2455, 1992.
- GREENAWAY, P.J., MURRAY, K. Heterogeneity and polymorphism in chicken erythrocyte histone fraction V. **Nature New Biol.**, v. 229, p. 233-238, 1971.
- GÜRTLER, H., KETZ, H.A., KOLB, E., SCHRÖDER, L., SEIDEL, H. A Fisiologia dos líquidos orgânicos. In: **Fisiologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, p. 223-238, 1987.
- GUYTON, A.C. Eritrócitos, anemia e policitemia. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, p. 313-319, 1992.
- HENGARTNER, M.O., HORVITZ, H.R. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. **Cell**, v. 76, p. 665-676, 1994.
- HODGES, R.D. The circulatory system. In: **The Histology of the Fowl**. London : Academic Press, p. 150-161, 1974.
- HOFFMANN, G., VÖLKER, H. Estructura General del organismo de las aves. In: **Anatomía y Fisiología de las Aves Domésticas**. España : Acribia, p. 43-50, 1969.
- JACOBSON, M.D., WEIL, M., RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, 347-354, 1997.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Membrana Plasmática. Digestão Intracelular. In: **Biologia Celular e Molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, p. 78-99, 1991.

- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Células do sangue. Hemocitopoese. In: **Histologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, p. 191-219, 1995.
- KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.
- KITZIS, A., DEFER, N., DASTUGUE, B., SABATIER, M.M., KRUIH, J. Effect of heparin on chromatin. **FEBS Letters**, v. 66, n. 2, p. 336-339, 1976.
- KUSUDA, R., IKEDA, Y. Studies on classification of eel leucocytes. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 53, n. 2, p. 205-209, 1987.
- LEVINE, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, p. 323-331, 1997.
- LIU, X., KIM, C.N., YANG, J., JEMMERSON, R., WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, p. 147-157, 1996.
- LIMA, A.O. *et al.* Hematologia. In: **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, p. 398-403, 1977.
- MAJNO, G., JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3-15, 1995.
- MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. Review Article. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 2, p. 257-264, 1997.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. São Paulo : Edgard Blücher-Funcamp. 71p. 1980.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C., DANTAS M.M., MONTEIRO, A.L.P. Discrimination of the nucleolus by a Critical Electrolyte Concentration method. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 26, p. 1-3, 1993.

- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C., MARIA, S.S. Morte Celular. In: RECCO-PIMENTEL, S.M. *et al.* **Biologia Celular**. Em preparação, 1998.
- MOURA, R.A.A. *et al.* Hematologia. Colheita de Material. In: **Técnicas de Laboratório**. 2. ed. São Paulo : Atheneu, p. 555-564, 1982.
- NELSON, D.A., DAVEY, F.R. Hematopoiese. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 18. ed. São Paulo : Manole, p. 701-711, 1995.
- NELSON, D.A., MORRIS, M.W. Exame Básico do Sangue. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 18. ed. São Paulo : Manole, p. 641-700, 1995.
- ROMER, A.S., PARSONS, T.S. Sistema circulatório. In: **Anatomia Comparada dos Vertebrados**. São Paulo : Atheneu, p. 359-367, 1985.
- ROSS, M.H., REITH, E.J., ROMRELL, L.J. Sangue. In: **Histologia Texto e Atlas**. 2. ed. São Paulo : Panamericana, p. 181-194, 1993.
- STELLER, H. Mechanisms and gene of cellular suicide. **Science**, v. 267, p. 1445-1449, 1995.
- STORER, T.I., USINGER, R.L. A rã como exemplo de animal. In: **Zoologia Geral**. 2. ed. São Paulo : Nacional, p.29, 1976.
- SUN, J.M., ALI, Z., LURZ, L., RUIZ-CARRILLO, A. Replacement of histone H1 by H5 *in vivo* does not change the nucleosome repeat length of chromatin but increases its stability. **EMBO Journal**, v. 9, n. 5, p. 1651-1658, 1990.
- SWENSON, M.J. Circulação sangüínea e sistema cardiovascular. In: **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, p. 13-34, 1988.
- VAUX, D.L. CED-4 – The third horseman of apoptosis. **Cell**, v. 90, p. 389-390, 1997.

- VIDAL, B.C. Image analysis and definition of nuclear phenotypes. **Braz. J. Genet.**, v. 20, n. 4, p. 749-754, 1997.
- VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. Critical Electrolyte Concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 22, n. 4, p. 471-478, 1989.
- VIDAL, B.C., BARBISAN, L.F., MARIA, S.S., RUSSO, J., MELLO, M.L.S. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. **Apoptosis**, v. 1, p. 218-221, 1996.
- VILLELA, G.G., BACILA, M., TASTALDI, H. Bioquímica Analítica de Materiais Biológicos. In: **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro : Guanabara, p. 270-275, 1973.
- WILLIAMS, G.T. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenes. **Cell**, v. 65, p. 1097-1098, 1991.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F.R., CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H.M., HORVITZ, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ - converting enzyme. **Cell**, v. 75, p. 641-652, 1993.
- ZOU, H., HENZEL, W.J., LIU, X., LUTSCHG A., WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, v. 90, p. 405-413, 1997.