



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

NÍVIA MAGALHÃES DA SILVA FREITAS

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE MINI CAVALOS PROCEDENTES DA ILHA
DO MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, BRASIL

BELÉM – PA
2012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

NÍVIA MAGALHÃES DA SILVA FREITAS

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE MINI CAVALOS PROCEDENTES DA ILHA
DO MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como exigência do Curso de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses

BELÉM – PA
2012

Freitas, Nívia Magalhães da Silva

Caracterização morfológica e ultraestrutural das células sanguíneas de mini cavalos procedentes da Ilha do Marajó, Estado do Pará, Brasil./ Nívia Magalhães da Silva Freitas. – Belém, 2012.

43f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

1. Mini cavalo. 2. Elementos sanguíneos. 3. Microscopia eletrônica. 4. Ilha do Marajó - Pará – Amazônia - Brasil. I. Título.

CDD: 636.109



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

NÍVIA MAGALHÃES DA SILVA FREITAS

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE MINI CAVALOS PROCEDENTES DA ILHA
DO MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área Saúde e Meio Ambiente para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM: 26 /04/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Profª. Drª. Carla Cristina Guimarães de Moraes - 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Profª. Drª. Ana Rita de Lima - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Profª Drª Nazaré Fonseca de Souza- 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

AGRADECIMENTOS

Aos pais Francisco Rodrigues de Freitas e Nádia Magalhães da Silva Freitas, e irmãos Tiago Magalhães da Silva Freitas, Bruno Magalhães da Silva Freitas, pelo amor, carinho e apoio durante todo o meu curso de Mestrado.

Aos meus colegas do Mestrado do PPGSPA, Monique Araújo Luz, Gláucia Mota Bragança, Mônica Riehl, Eliane Lima, Darlene Kássia, Gilmara Abreu, Marcello Monte Santo e Heriberto Figueiredo que me proporcionaram conhecer o verdadeiro significado da palavra companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica do HOVET-UFRA, Larissa Seixas, Dinaiara Fragoso e Flávia Matos pelo apoio na área laboratorial e aos colegas da Clínica de Equinos, Thiago Mangas, Elton Everton e Rosa Rodrigues pelo apoio nos trabalhos de campo.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia pelos conhecimentos compartilhados. Dando-nos a oportunidade de conhecer novos caminhos. Em especial, ao professor Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses com o qual tive a oportunidade de trabalhar junto.

Ao PROCAD UFRA-UFPE-UNESP, em especial ao Prof. Dr. Helio Langoni, pela oportunidade de orientação em treinamento realizado no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da UNESP-Botucatu, contribuindo na minha formação de pós-graduação.

Ao professor Dr. José Ribamar Felipe Marques e aos funcionários do BAGAM - CEMES por terem me recebido e apoiado na Fazenda da EMBRAPA, unidade Salvaterra, Ilha do Marajó, para coleta de material do meu trabalho.

A professora Dr^a Edilene Oliveira da Silva, do Laboratório de Parasitologia e Biologia Estrutural da UFPA e a professora Dr^a Maria Angêlica Miglino, do Laboratório de Anatomia Microscópica e Desenvolvimento da FMVZ-USP, por terem cedido os respectivos laboratórios, permitindo o perfeito andamento do meu trabalho.

A professora Dr^a Ana Rita de Lima, Dr^a Rose Eli Azarias e a Msc. Maria Letícia Baptista Salvadori pelo apoio técnico no Laboratório de Anatomia Microscópica e Desenvolvimento da FMVZ-USP, para finalização do meu trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo descrever as características morfológicas e ultraestruturais das células sanguíneas do mini cavalo Puruca procedente da Ilha do Marajó. Foram colhidas amostras de sangue de 27 animais, com idades que variavam de 3 meses à 10 anos e de ambos os sexos, dos quais 10 animais foram selecionados para o estudo através da microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram processadas para observação das hemácias, leucócitos e plaquetas. As células foram preparadas de acordo com protocolo padrão para microscopia eletrônica de transmissão e submetidas a análises qualitativas, destacando as características morfológicas ultraestruturais. As hemácias e todos os tipos de leucócitos foram observados nas amostras analisadas. O diâmetro médio dos leucócitos foi de 5,9 μm . Os neutrófilos bastonetes e segmentados apresentaram ultraestrutura de contorno arredondado, emissão de pequenos pseudópodes e mostraram quantidade variável de grânulos arredondados. Os eosinófilos observados apresentaram formato arredondado com projeção de pseudópodes, núcleo de formato irregular e grandes grânulos com formato arredondado. Os basófilos se apresentaram arredondados e demonstraram a presença de inúmeros grânulos eletrodensos. Os linfócitos avaliados apresentaram núcleo grande, central e citoplasma escasso. Os monócitos apresentaram-se arredondados, com discreta projeção de pseudópodes e núcleo em forma de ferradura. As plaquetas visualizadas apresentaram diferentes aspectos morfológicos. As características ultraestruturais encontradas neste trabalho foram semelhantes às descritas na literatura para eqüinos. Este é o primeiro estudo versando sobre a raça em questão no Brasil.

Palavras chave: Puruca, elementos sanguíneos, características ultraestruturais.

ABSTRACT

The objective of the present study was to describe the morphological and ultrastructural characteristics of the blood cells of Puruca horses. Blood samples were obtained from a total of 27 Puruca horses of both sexes, with ages of between 3 months and 10 years. The samples of 10 of these animals were selected for study using a transmission electron microscopy. The samples were processed for the observation of the erythrocytes, leukocytes, and platelets, prepared according to the standard protocol for transmission electron microscopy, and analyzed qualitatively, focusing on ultrastructural morphological characteristics. The erythrocytes and all the different types of leukocytes were observed in the samples. The mean diameter of the leukocytes was 5.9 μm . The ultrastructure of the band and segmented neutrophils were characterized by a rounded outline, with small pseudopods extending outwards, and variable quantities of rounded granules. The eosinophils observed were also rounded with projecting pseudopods, an irregularly-shaped nucleus, and large, rounded granules. The basophils were also rounded, and contained innumerable electro-dense granules. The lymphocytes had large, central nuclei and a reduced quantity of cytoplasm. The monocytes were rounded, with discreet pseudopods and horseshoe-shaped nuclei. The observed platelets presented a number of different morphological features. The ultrastructural characteristics observed in the present study were similar to those described in the literature for equines. This is the first study to focus on the Puruca breed from Brazil.

Keywords: Puruca, blood elements, ultrastructural characteristics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (A e B) - (A) Mini cavalo Puruca pelagem do tipo Tordilha e (B) mini cavalo Puruca pelagem do tipo Alazão, domiciliados na Fazenda EMBRAPA - Salvaterra (PA).....	11
Figura 2 – Eritrócitos normais de eqüinos exibindo leve palidez central e tendência a formar rouleaux.....	12
Figura 3 – Neutrófilo bastonete de eqüino.....	14
Figura 4 – Neutrófilos segmentados de eqüino.....	15
Figura 5 – Eosinófilo eqüino.....	16
Figura 6 – Eletromicrografia de eosinófilo eqüino, demonstrando a presença de grandes grânulos com formato arredondado e homogêneo.....	16
Figura 7 – Basófilo eqüino.....	17
Figura 8 – Linfócito eqüino.....	18
Figura 9 – Monócito com núcleo lobulado, abundante citoplasma cinza, vacúolos e pseudopodia.....	19
Figura 10 – Eletromicrografia de plaqueta normal de eqüino. (α) grânulos, (G) grânulos de glicogênio, (MP) membrana plasmática.....	20
Figura 11 - Eletromicrografia panorâmica de hemácias de mini cavalos Puruca. (Escala de barra = 5 μ m).....	28
Figura 12 – Eletromicrografia de neutrófilo do mini cavalo Puruca. (N) Núcleo; (Hc) heterocromatina; (Ec) eucromatina; (Mni) membrana nuclear interna; (Mne) membrana nuclear externa; (C) citoplasma; (G) complexo de golgi; (Gr) grânulo; (M) mitocôndria; (Ps) pseudópodes. (Escala de barra = 2 μ m).....	29
Figura 13 – Eletromicrografia de neutrófilo segmentado do mini cavalo Puruca (acima), plaqueta (baixo). Observa-se núcleo trilobulado. (Escala de barra = 2 μ m)	30
Figura 14 – Eletromicrografia de eosinófilo do mini cavalo Puruca. (N) Núcleo; (C) citoplasma; (M) mitocôndria; (Gr) grânulos; (Cg) cisternas de complexo de golgi; (Ps) pseudópodes (Escala de barra = 2 μ m).....	31
Figura 15 – Eletromicrografia de basófilo do mini cavalo Puruca. (C) Citoplasma; (G) grânulos; (Ps) pseudópodes. (Escala de barra = 2 μ m).....	32
Figura 16 – Eletromicrografia de linfócito do mini cavalo Puruca. (C) Citoplasma; (N) núcleo; (M) mitocôndria; (H) heterocromatina; (Ec) eucromatina; (Mne) membrana nuclear externa; (Mni) membrana nuclear interna;	

(Ps) pseudópodes; (Lv) lúmen vascular. (Escala de barra = 2 μ m)..... 33

Figura 17 – Eletromicrografia de monócito do mini cavalo Puruca. (N) Núcleo; (C) citoplasma; (M) mitocôndria; (Ec) eucromatina; (Hc) heterocromatina; (Mn) membrana nuclear; (Ci) cisternas do complexo de golgi; (Ps) pseudópodes. (Escala de barra = 2 μ m)..... 34

Figura 18 – Eletromicrografia de uma plaqueta normal do mini cavalo Puruca, mostrando presença de grânulos de glicogênio (G), α -grânulos (α), mitocôndria (M) e plasmalema (P). (Escala de barra = 1 μ m)..... 35

Figura 19 – Eletromicrografia mostrando plaquetas com formas irregulares. (A) Plaqueta apresentando grânulos de glicogênio (G), α -grânulos (α) e plasmalema (P). (B) Plaqueta demonstrando formato ovóide com início de projeção de pseudópodes. (C) Plaqueta de forma lentiforme, apresentando sistema canalicular aberto (SCA), plaqueta de forma discóide, típica de plaqueta ativada. (D) Plaqueta demonstrando emissão de pseudópodes. (Escala de barra = 2 μ m)..... 36

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	6
1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	9
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1.1 Histórico do Mini Cavalo Puruca.....	10
1.2.1 Elementos Sanguíneos.....	12
1.2.1.1 Hemácias.....	12
1.2.1.2 Leucócitos.....	13
1.2.1.2.1 Neutrófilos.....	14
1.2.1.2.2 Eosinófilos.....	15
1.2.1.2.3 Basófilos.....	17
1.2.1.2.4 Linfócitos.....	17
1.2.1.2.5 Monócitos.....	18
1.2.1.3 Plaquetas.....	19
REFERÊNCIAS.....	21
2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE MINI CAVALO PURUCA PROCEDENTES DA ILHA DO MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, BRASIL.....	24
2.1 INTRODUÇÃO.....	25
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.3 RESULTADOS.....	28
2.4 DISCUSSÃO.....	37
2.5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	42

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O mini-cavalo Puruca é subespécie distinta, possuindo características que o diferenciam de outras raças. Estas diferenças aparecem no esqueleto, conformação e rusticidade, conferindo ao mesmo, características bastante peculiares, onde o tamanho reduzido é o mais marcante deles (MARQUES; COSTA; OHAZE, 2001).

As espécies equinas comuns (cavalos, burros, mulas e seus híbridos) têm várias diferenças hematológicas como resultado/influência de variáveis como idade, raça, sexo, status reprodutivo, status emocional e atividade física. Entretanto, as observações comparativas entre pôneis e cavalos são frequentemente equivalentes (GRONDIN; DEWITT, 2010).

O hemograma é um exame muito utilizado na clínica médica equina, sendo um indicador de alterações que podem não ser percebidas ao exame clínico (FAILACE, 2006), além de servir como procedimento para avaliar a saúde animal e auxiliar na obtenção de um diagnóstico definitivo (SANTOS, 1999; FAILACE, 2006).

A avaliação dos elementos celulares do sangue, quantitativamente e qualitativamente, fornece informações indispensáveis ao controle evolutivo das doenças (FAILACE, 2006), porém se comparados a valores de referência que não se enquadram nas características pertinentes ao animal em questão, poderão resultar em diagnósticos errôneos (VEIGA, 2004).

Basicamente existem dois tipos de cavalos, a partir dos quais se desenvolveram muitas raças. Os cavalos que descendem do cavalo árabe são chamados de sangue quente, enquanto que os cavalos de sangue frio correspondem aos cavalos de tiro e os pôneis. Uma característica importante a ser ressaltada quando se leva em consideração este tipo de classificação, é que aqueles indivíduos denominados de sangue quente possuem um número maior de eritrócitos quando comparados aos de sangue frio (SCHALM, 1964; KRAMER, 2000).

Imagawa et al. (1989), Fugimaki e Isoda (1990), indicam a microscopia eletrônica de transmissão no estudo de células sanguíneas com o objetivo de fornecer dados sobre organelas citoplasmáticas e estruturas intracelulares, necessárias em pesquisas de citofisiologia.

Este trabalho teve o objetivo de identificar e descrever a ultraestrutura das células sanguíneas de *Equus caballus* (mini cavalo puruca), procedentes da Ilha do Marajó, estado do Pará, Brasil, por meio da observação de amostras processadas segundo a rotina de fixação química ao microscópio eletrônico de transmissão.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Histórico do mini cavalo Puruca

O cavalo é um mamífero ungulado, da ordem Perissodactyla, da família dos Equidae, do gênero *Equus* e da espécie *Equus caballus*. O animal primitivo e em estado selvagem tornou-se robusto e mais possante, quando passou a ser capturado pelo homem, domado e treinado para servir de animal de tração e de carga (BRAGA, 2000).

Como as condições em que se desenvolveram foram as mais diversas, tais como clima, meio ambiente, modo de vida e outros, atuando sobre várias gerações, o resultado foi que surgiram animais diferentes, dando então surgimento a diferenças em tamanho, constituição, proporcionalidade, caráter, temperamento e inteligência, e que fazem distinguir as várias espécies (BRAGA, 2000).

Dentre as diversas raças de cavalos originadas no Brasil podem-se destacar as Marajoara e Puruca na Ilha do Marajó, no Pará (COSTA et al., 2005). O mini-cavalo Puruca é o resultado de cruzamentos do cavalo Marajoara com pôneis da raça “Shetland”, de origem inglesa, vindos da França na penúltima década do século XIX. Desses cruzamentos foram selecionados animais, cuja principal característica era altura padrão de no máximo, 1,18m (TEIXEIRA, 1995)

A equinocultura marajoara, como em algumas regiões do Brasil caracteriza-se por ser coadjuvante de outras criações, como a bovinocultura e a bubalinocultura, muito embora seja fundamental para o manejo extensivo em toda ilha (RIBEIRO et al., 2006).

O mini cavalo Puruca apresenta temperamento enérgico, vivo, ativo e dócil, com o andamento na forma de trote. As suas principais características e funções são: animal de serviço, atrativo nas fazendas, com grande resistência aos locais pantanosos, adaptação ao clima da região e velocidade a galopes curtos (Figura 1) (COSTA et al., 2005).



Figura 1 (A e B) – (A) Mini cavalo Puruca pelagem do tipo Tordilha e (B) mini cavalo Puruca pelagem do tipo Alazão, domiciliados na Fazenda EMBRAPA - Salvaterra (PA).

1.2.1 Elementos Sanguíneos

O sangue é composto de uma parte líquida e outra celular. A parte líquida, denominada plasma, é obtida após a centrifugação quando se colhe o sangue com anticoagulante, e contém o fibrinogênio e o soro quando sem anticoagulante. A parte celular é composta pelos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Nos mamíferos, apenas os leucócitos possuem núcleo; as hemácias perdem durante sua formação, e as plaquetas são fragmentos de citoplasma da célula progenitora, os megacariócitos (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007)

1.2.1.1 Hemácias

As hemácias de mamíferos são anucleadas, arredondadas e relativamente bicôncavas na maioria das espécies de mamíferos (THRALL, 2007). A principal função das hemácias é o transporte de oxigênio/ dióxido de carbono entre os tecidos e os pulmões com a hemoglobina como carreadora do O_2/CO_2 (KERR, 2003).

As células vermelhas de equinos são discos bicôncavos (GRONDIN; DEWITT, 2010), de tamanho menor que a dos cães (THRALL, 2007). Possuem 5-7 μm de diâmetro, leve ou nenhum grau de palidez central e meia vida de 140-155 dias (LATIMER; RAKICH, 2002; GRONDIN; DEWITT, 2010) (Figura 2).

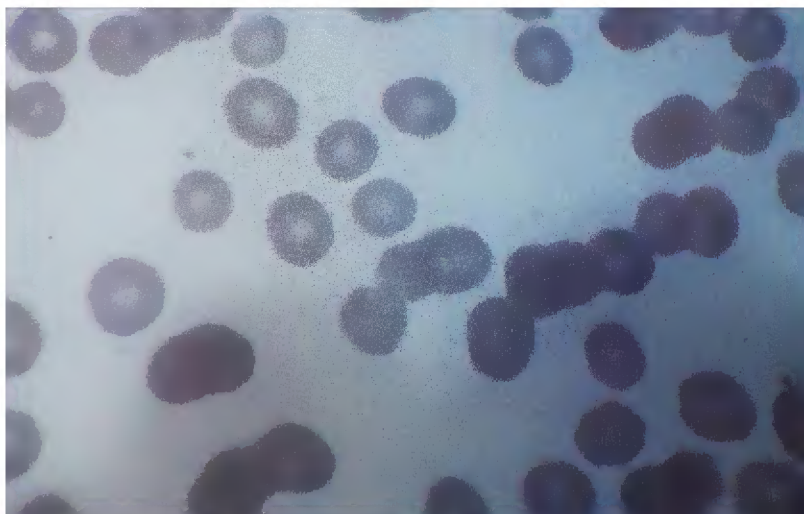


Figura 2 – Eritrócitos normais de equinos exibindo leve palidez central e tendência a formar rouleaux.

Fonte: Latimer; Rakich (2002).

Na classificação morfológica das hemácias, considera-se cor, tamanho, forma, estruturas eritrocitárias e distribuição das células no esfregaço sanguíneo. As diferenças significativas entre as hemácias das espécies incluem tamanho, forma, grau de palidez central, tendência em formar rouleaux, presença de pontilhado basofílico e de reticulócitos na resposta regenerativa à anemia (THRALL, 2007).

Segundo Morris (1993), para correta interpretação de dados hematológicos, o clínico precisa apreciar algumas características que distinguem o cavalo dos outros animais domésticos. O cavalo possui um baço muscular altamente innervado, que normalmente contém até um terço da massa eritrocitária potencialmente circulante (MORRIS, 1993) e esta reserva pode ser mobilizada pelo exercício, estresse ou excitação (SATUE; BLANCO; MUNOZ, 2009).

Outra característica comum das hemácias de equinos é a formação de rouleaux que corresponde ao posicionamento espontâneo das hemácias em forma de pilhas lineares, assemelhando-se a pilha de moedas (LATIMER; RAKICH, 2002; THRALL, 2007).

Rouleaux são responsáveis pela rápida taxa de sedimentação dos eritrócitos do sangue dos equinos (JAIN, 1986; LATIMER; RAKICH, 2002). Aumento na formação de rouleaux pode ser visto com hiperglobulinemia e hiperfibrinogemia (THRALL, 2007; GRONDIN; DEWITT, 2010). A mistura completa do sangue é requerida para evitar mensurações de laboratório errôneas que resultam de uma rápida sedimentação (GRONDIN; DEWITT, 2010).

Com frequência, a morfologia das hemácias auxilia muito na definição do diagnóstico etiológico de anemia e, as vezes, também é útil no diagnóstico de outras disfunções (THRALL, 2007). De acordo com Morris (1993), no caso do eritron equino, os esforços diagnósticos são mais complicados e confundidos pelo fato de que apenas eritrócitos maduros são liberados no sangue periférico.

Os eritrócitos de equinos são retidos na medula óssea, até que a síntese de hemoglobina se tenha completado; assim policromasia (reticulocitose), macrocitose, e outros sinais do sangue periférico, de regeneração da medula óssea, manifestados por outras espécies, são extremamente raros em cavalos (MORRIS, 1993).

1.2.1.2 Leucócitos

Os leucócitos são células de defesa importantes tanto nos mecanismos específicos quanto nos inespecíficos. Estas células são divididas em dois grupos – granulócitos e

agranulócitos – de acordo com suas características celulares e padrões de coloração com corantes específicos (BLACK, 2002). Os granulócitos (ou mielócitos) incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos (VEIGAS, 2004), todos produzidos na medula óssea (MORRIS; LARGE, 1993). Os agranulócitos incluem os linfócitos e os monócitos (KERR, 2003).

Todos participam da defesa orgânica, porém cada um é funcionalmente independente (VEIGA, 2004). A interpretação das contagens de leucócitos do sangue auxilia na compreensão sobre as possíveis disfunções apresentadas pelo paciente. A morfologia dos leucócitos é geralmente semelhante entre os mamíferos (WEISER; THRALL, 2007).

1.2.1.2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos de mamíferos participam da resposta inflamatória por meio da quimiotaxia positiva ao tecido inflamado e fagocitose de microorganismos e outros materiais estranhos (VEIGA, 2004; MORRIS; LARGE, 1993; WEISER; THRALL, 2007). Os neutrófilos imaturos (bastonetes) não possuem núcleo lobulado (Figura 3). O aparecimento de uma reentrância no núcleo é suficiente para classificar a célula como adulta, mas o núcleo continua a se tornar mais e mais lobulado com o envelhecimento da célula (KERR, 2003).

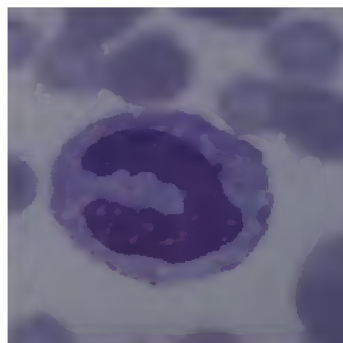


Figura 3 – Neutrófilo bastonete de equino.
Fonte: Latimer; Rakich (2002).

Os neutrófilos em estado maduro alcançam entre 10 a 12 μ m de diâmetro e compreendem 50% dos leucócitos totais (BANKS, 1995). O neutrófilo segmentado ou maduro apresenta membrana nuclear irregular, com uma ou mais constrições e grânulos neutrofílicos (WEISER; THRALL, 2007). O citoplasma de neutrófilos normais é azulado em colorações do tipo Leishman (KERR, 2003) (Figura 4).

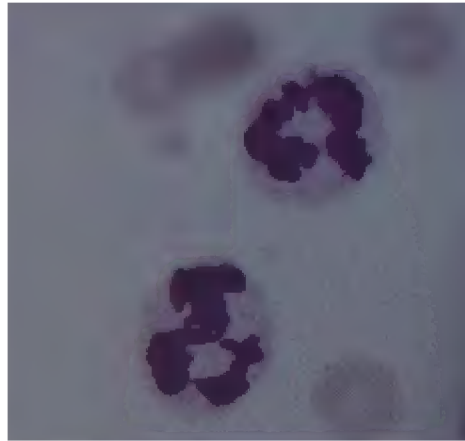


Figura 4 – Neutrófilos segmentados de equino.
Fonte: Latimer; Rakich (2002).

Em trabalho realizado por Sonoda e Kobayashi (1966), utilizando a microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que neutrófilos de equinos com um a três lobos nucleares foram mais frequentes em número. Entretanto, células com mais de quatro lobos nucleares também foram comumente observadas. Os mesmos autores complementam ainda que células sem lobos nucleares – apenas citoplasma – não foram incomuns.

1.2.1.2.2 Eosinófilos

São células extremamente importantes no controle das infecções parasitárias e na regulação das reações inflamatórias e alérgicas (MORRIS; LARGE, 1993). O exame ultraestrutural dos grânulos de eosinófilos de mamíferos revela uma forma distinta cristalina que varia de acordo com a espécie (WEISER; THRALL, 2007).

Os eosinófilos são ligeiramente maiores que neutrófilos e lembram framboesas, além de terem núcleo lobulado e uniformemente grande, arredondado e grânulos de coloração vermelho-vivo (LATIMER; RAKICH, 2002; WEISER; THRALL, 2007). Esses grânulos são particularmente proeminentes em eosinófilos de equinos (JAIN, 1993; KERR, 2003) (Figura 5).

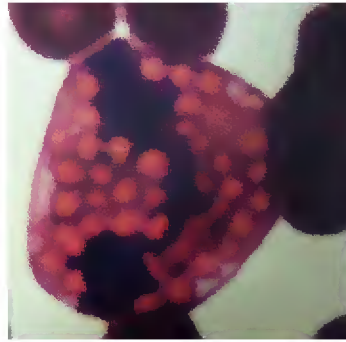


Figura 5 – Eosinófilo equino.
Fonte: Kerr, 2002.

Existem dois tipos de grânulos, homogêneo e cristalóide, que caracterizam os eosinófilos. Algumas espécies parecem ter grânulos consistentemente cristalóides ou parcialmente cristalóides, enquanto outros como os bovinos e equinos apresentam apenas grânulos homogêneos (JAIN, 1993).

Stockert (2005), afirma que os eosinófilos dos eqüinos são facilmente reconhecidos como elementos individuais na microscopia ótica, e essa característica faz dessas células modelos adequados para análises citoquímicas e correlações precisas em microscopia eletrônica. Em seu trabalho, Stockert (2005) mostrou que os grânulos dos eosinófilos de equinos têm um núcleo eletrodense, não cristalino, rodeado por uma matriz externa menos densa, embora houvesse uma considerável heterogeneidade em sua morfologia ultraestrutural (Figura 6).

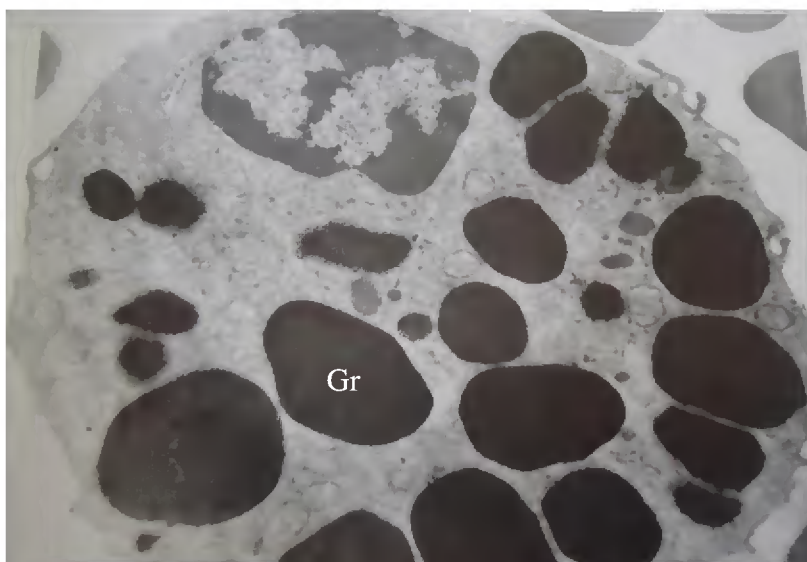


Figura 6 – Eletromicrografia de eosinófilo eqüino, demonstrando a presença de grandes grânulos com formato arredondado e homogêneo (Gr).
Fonte: Yong, (2000).

1.2.1.2.3 Basófilos

Os basófilos, os menos numerosos entre os leucócitos, são relativamente raros no sangue das espécies animais de grande porte (MORRIS; LARGE, 1993), mas são quase sempre encontrados no sangue de cavalos (KERR, 2003)

Os basófilos dos equinos apresentam poucos a vários grânulos roxos que variam em tamanho e forma. Quando os grânulos são abundantes, eles mascaram o núcleo. O núcleo do basófilo é menos segmentado comparado ao núcleo de neutrófilos maduros. O citoplasma varia de transparente a azul claro (LATIMER; RAKICH, 2002; GRONDIN; DEWITT, 2010) (Figura 7).



Figura 7 – Basófilo equino.
Fonte: Latimer; Rakich (2002).

Ao microscópio eletrônico, basófilos imaturos apresentam grânulos homogêneos, enquanto basófilos maduros podem apresentar uma série de partículas densas, fibrilas ou lamelas ou um padrão de favo de mel dependendo da espécie e da maturidade dos grânulos (JAIN, 1993).

1.2.1.2.4 Linfócitos

Os linfócitos do sangue representam um variado conjunto de subpopulações linfocitárias; porém, não é possível diferenciar tais subpopulações no exame de esfregaço sanguíneo ou por meio de técnicas utilizadas na rotina dos laboratórios clínicos veterinários (KERR, 2002; THRALL, 2007).

Eles são a base do desencadeamento e execução da resposta imune (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Os linfócitos apresentam núcleo arredondado a oval e quantidade mínima de citoplasma claro, quase incolor. A área citoplasmática pode ser variável. Os

linfócitos circulantes normais apresentam diâmetro menor que os neutrófilos (WEISER; THRALL, 2007) (Figura 8).



Figura 8 – Linfócito equino.
Fonte: Kerr (2002).

As formas de linfócitos menos comuns são os reativos e os granulares. As formas reativas são os linfócitos B capazes de produzir imunoglobulina. Apresentam citoplasma intensamente basofílico e os núcleos podem ter forma mais irregular. Além disso, o núcleo pode exibir uma fenda ou ter forma amebóide. Os linfócitos granulares têm pequena quantidade de grânulos de coloração róseo-púrpura. São grandes linfócitos granulares e acredita-se que alguns deles sejam natural killer ou células T (WEISER; THRALL, 2007).

1.2.1.2.5 Monócitos

Os monócitos de mamíferos têm núcleo ovóide, em forma de ferradura, sendo excêntrico. O formato do núcleo representa diferentes estágios de amadurecimento destas células (NICHOLS; BAINTON; FARQUAR, 1971).

A forma do núcleo é muito variada, particularmente entre as espécies, mas as formas típicas são as formas de rim, bastão, folha de trevo e trilobulado. Os monócitos com núcleos em forma de rim ou bastão são facilmente confundidos com metamielócitos e neutrófilos bastonetes, enquanto os monócitos jovens com núcleo redondo parecem muito com linfócitos (KERR, 2003). Possuem citoplasma de coloração cinza-azulada com granulações delgadas e frequentes vacúolos (WALKER, 2009) (Figura 9).

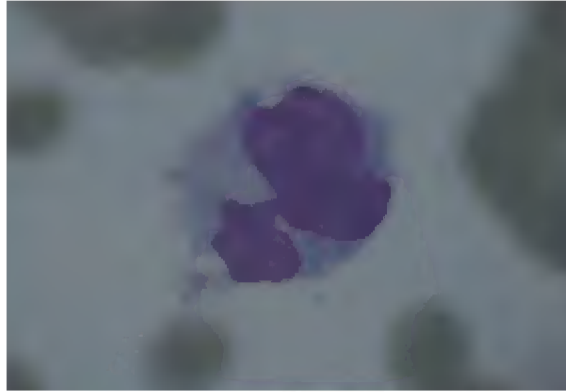


Figura 9 – Monócito com núcleo lobulado, abundante citoplasma cinza, vacúolos e pseudopodia.

Fonte: Latimer; Rakich (2002).

Ao microscópio eletrônico o citoplasma do monócito mostra-se abundante (JAIN, 1993), com quantidade média de ribossomos e retículo endoplasmático muito desenvolvido. Há algumas mitocôndrias alongadas e o aparelho de Golgi é desenvolvido. Nas áreas próximas à reentrância nuclear, geralmente observam-se microtúbulos e microfilamentos (NICHOLS; BAINTON; FARQUAR, 1971).

Os monócitos são os leucócitos de maior tamanho (BANKS, 1995; KERR, 2003), alcançando 15 a 20 μ m de diâmetro. O sangue do cavalo possui ao redor de 4% de monócitos, de aspecto bastante típico (BANKS, 1995).

1.2.1.3 Plaquetas

As plaquetas de mamíferos são fragmentos citoplásmicos de megacariócitos, com várias organelas citosólicas (THRALL, 2007). Kerr (2003) cita que são de coloração azul pálida, anucleadas e normalmente menores que as hemácias. Segundo Lopes, Biondo e Santos (2007) as plaquetas medem de 2 a 5 μ m de diâmetro. Por causa do seu tamanho, elas estão frequentemente sobrepostas (KERR, 2003).

A contagem e função das plaquetas podem ser estimadas por vários métodos. A contagem pode ser determinada em contadores automatizados ou manuais, podendo ser estimada em esfregaço sanguíneo (THRALL, 2007).

Jain (1993) cita que as plaquetas de várias espécies de mamíferos geralmente tem ultraestrutura similar. Estudos com microscopia eletrônica de varredura têm mostrado que

plaquetas têm caracteristicamente uma forma discóide ou lentiforme, com contorno bastante suave e ligeiramente biconvexo, além de mostrar recortes de superfície rasa e granularidade.

Segundo o autor anteriormente citado, estudos de microscopia eletrônica de transmissão tem revelado algumas características ultraestruturais únicas. A membrana das plaquetas normais é coberta com um material amorfo que forma uma fina camada externa, rica em glicoproteínas. A estrutura interna das plaquetas é composta de vários grânulos α e partículas de glicogênio (Figura 10), alguns grânulos densos, e algumas mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos. Um aparelho de golgi pouco desenvolvido pode ser visto ocasionalmente nas plaquetas, mas cisternas de reticulo endoplasmático liso e rugoso e ribossomos são raramente encontrados.

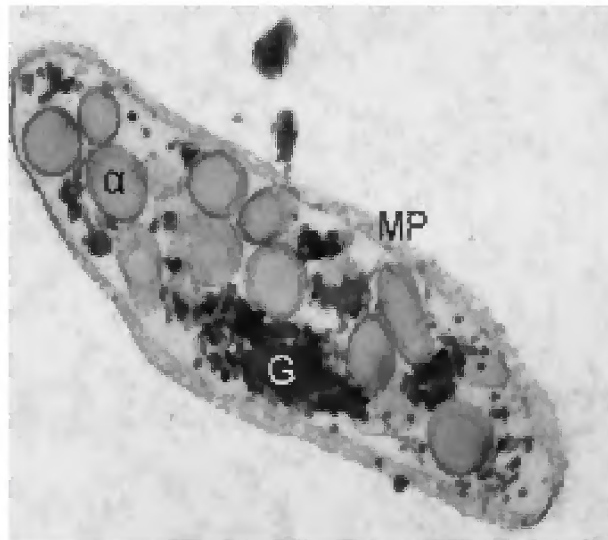


Figura 10 - Eletromicrografia de plaqueta normal de equino. (α) Grânulos, (G) grânulos de glicogênio, (MP) membrana plasmática.

Fonte: Paes Leme et al. (2006).

REFERÊNCIAS

- BANKS, W. Sangre periférica. En: BANKS, W. **Histología veterinaria aplicada**. 2 ed. México: El manual moderno, 1995
- BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829p.
- BRAGA, R. M. **Cavalo lavradeiro em Roraima. Aspectos históricos, ecológicos e de conservação**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 119p.
- COSTA, R. M.; MARQUES, J. R. F.; VEJA-PLA J. L.; BERMEJO, J. V. D.; SAMPAIO, M. I. C.; GALLARDO, P. P. R. Variabilidade genética de equinos da Amazônia brasileira. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 35, p.52-55, 2005.
- FAILACE, R. **Hemograma**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 298p.
- FUJIMAKI, Y.; ISODA, M. Fine structural study of leucocytes in the goldfish. *Carassius auratus*. **J. Fish. Biol.**, v.36, n.1, p.821-831, 1990.
- GRONDIN, T. M.; DEWITT, S. Normal hematology of the horse and donkey. In: WEISS, D.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Wiley-Blackwell: USA, 2010. 821-828 p.
- IMAGAWA, T.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, N; KUDO, N; SUGIMURA, M. Morphology of bloodcells in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.51, n.6, p.1163-1172, 1989.
- JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221 p.
- KERR, M. G. **Veterinary laboratory medicine**. 2 ed. USA: Blackwell Science, 2002. 368 p.
- KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. São Paulo: Roca, 2003. 436 p.
- KRAMER, J. Normal hematology of the horse. In: FELDMAN, B. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1069-1074 p.
- LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 6 ed. Mosby: St. Louis, 2002. 200-216 p.
- LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3 ed. Santa Maria: UFMS/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107p.

MARQUES, J. R. F.; COSTA, M. R.; OHAZE, M. M. Conservação e caracterização de equídeos da ilha de Marajó em estudo no BAGAM. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE “Recursos genéticos: conservar para a vida”, 3, 2001, Londrina, Paraná. **Anais...**

MORRIS, D.D. Alterações no eritron. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo: Manole, 1993. 429-435 p.

MORRIS, D.D.; LARGE, S. M. Alterações no leucograma. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo: Manole, 1993. 437-446 p.

NICHOLS, B. A.; BAINTON, D.F., FARQUAR, M. G. Differentiation of monocytes, origin, nature, and fate of their azurophil granules. **J. Cell. Biol.**, v. 50, n.2, p. 498-515, 1971.

PAES LEME, F.O.; WURZINGER, L. J. VASCONCELOS, A.C. **Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.2, p.149-157, 2006.

RIBEIRO, D. B.; MARQUES, J. R. F.; COSTA, M. R.; CAMARGO Jr, R. N. C.; MARQUES, L. C.; RODRIGUES, A. E. Cavalo marajoara. In: MARQUES, J. R. F. **Produção animal na Ilha do Marajó**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 115-128p.

SANTOS, L. C. **Laboratório ambiental**. Cascavel – PR : Edunioeste,1999.

SATUE, K. BLANCO, O. MUNOZ, A. AGE-related differences in the hematological profile of Andalusian broodmares of Carthusian strain. **Veterinarni Medicina**, v. 54, n. 4, p. 175-182, 2009.

SCHALM, O. N. **Hematologia veterinária**. México: Union Tipográfica Editorial Hispano Americano, 1964. 404 p.

SONODA, M.; KOBAYASHI, K. Electron microscopic observations on the blood of the horse – neutrophils in the peripheral blood of the clinically healthy horses. **Jap. J. Vet. Res.**, v. 14, n. 1,2. p. 71-85, 1966.

STOCKERT, J. C. The horse eosinophil as a model leucocyte for morphological and citochemical studies. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 22, n. 2, p. 73-84, 2005.

TEIXEIRA, J. C. Condicionamentos históricos e ecológicos do cavalo marajoara. **O cavalo marajoara**, n. 12, p. 13, 1995.

THRALL, M. N. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

VEIGA, A. P. M. **Valores hematológicos, PPT e fribrinogênio do cavalo crioulo – suas variações em relação ao sexo, idade e manejo**. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Clínica Médica) Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, 2004.

WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. In: COWELL, R. L. et al. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3 ed. São Paulo: MedVet, 2009. 390–422 p.

WEISER, G. THRALL, M. A. Considerações sobre leucócitos e leucogramas. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

YONG, K. M. Eosinophils. In: FELDMAN, B.V. ZINL, J. G. JAIN, N.C. **Shalm's veterinary hematology**. 5th ed. Wiley-Blackwell: USA, 2000. 297-307p.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE MINI CAVALOS PURUCA PROCEDENTES
DA ILHA DO MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE MINI CAVALOS
PURUCA

*Nívia Magalhães da Silva Freitas¹, Andre Marcelo Conceição Meneses¹, Edilene Oliveira da Silva², José Ribamar Marques³, Ana Rita de Lima¹, Maria Angêlica Miglino⁴, Carla Cristina Guimarães de Moraes⁵, Nazaré Fonseca de Souza¹

1 - Departamento de Medicina Veterinária, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, PA CEP 66077-550, Brasil. E-mail: nivia_medvet2002@yahoo.com.br, andre.meneses@ufra.edu.br, ana.lima@ufra.edu.br, nazavet@bol.com.br.

2- Laboratório de Parasitologia e Biologia Estrutural, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 01, Bairro Guamá, Belém, PA, Brasil, CEP 66075-110, Caixa postal 479. E-mail: edilene@ufpa.br

3- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, [Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/nº Caixa Postal 48, Belém, PA, Brasil, CEP 66095-100](mailto:jrrffm@gmail.com). E-mail: jrrffm@gmail.com

4 – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Anatomia Microscópica e Desenvolvimento, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil, CEP 05508-270. E-mail: miglino@usp.br

5 – Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Av. dos Universitários s/n – Jaderlandia, Castanhal, PA, Brasil, CEP: 68746-360. E-mail: ccmoraes@ufpa.br

***Autor para correspondência.** Departamento de Medicina Veterinária, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, PA, CEP 66077-550, Brasil, Tel. (91) 32105177. E-mail: nivia_medvet2002@yahoo.com.br

** Artigo formatado de acordo com as normas da revista Microscopy Research and Technique.

2.1 INTRODUÇÃO

Dentre as diversas raças de cavalos originadas no Brasil podem-se destacar as Marajoara e Puruca na Ilha do Marajó, no Pará (COSTA et al., 2005). O mini-cavalo Puruca é o resultado de cruzamentos do cavalo Marajoara com pôneis da raça “Shetland”, de origem inglesa, vindos da França na penúltima década do século XIX. Desses cruzamentos foram selecionados animais, cuja principal característica era altura padrão de, no máximo, 1,18m (Teixeira, 1995).

A população de cavalos Puruca é cerca de 10.000 cabeças, os machos podem atingir de 200-220 kg e as fêmeas de 160-170 kg. São usados como animais de sela, na lida diária do manejo do gado nas fazendas da região, além disso, são utilizados em várias iniciativas de lazer e turismo, como: provas de resistência, esforço, corrida, rodeios, além do “tiro”, uma prova de arrancada, onde a força e a estrutura corporal dos animais devem estar aliadas (Marques, Costa e Ohaze, 2001).

O mini cavalo Puruca, em virtude do pequeno porte, inteligência e docilidade, é muito apreciado por adultos e crianças, sendo um grande recurso para o turismo rural, visto ser uma atividade emergente e muito promissora para a Ilha do Marajó, estado do Pará, Brasil (Marques, Costa e Ohaze, 2001).

Imagawa et al. (1989), Fugimaki e Isoda (1990), indicam a microscopia eletrônica de transmissão no estudo de células sanguíneas com o objetivo de fornecer dados sobre organelas citoplasmáticas e estruturas intracelulares, necessárias em pesquisas de citofisiologia.

Este trabalho teve o objetivo de identificar e descrever a ultraestrutura das células sanguíneas de *Equus caballus* (mini cavalo Puruca), procedentes da Ilha do Marajó, estado do Pará, Brasil, através da observação de amostras processadas segundo a rotina de fixação química ao microscópio eletrônico de transmissão. Este é o primeiro estudo ultraestrutural versando sobre a raça em questão no Brasil.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Banco de Germoplasma Animal da Amazônia (BAGAM), que é parte do Campus Experimental “Emerson Salimos” (CEMES), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizado a 48°30'54" de longitude W e 00°45'21" de latitude S, na mesorregião geográfica do Marajó.

Foram efetuadas coletas de sangue de 10 mini cavalos (Puruca), sendo 8 fêmeas e 2 machos, com idades que variaram de 3 meses à 10 anos de idade. De cada animal foram colhidos 5mL de sangue por meio de punção jugular em tubo de colheita a vácuo com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético 11% (EDTA) para realização do hemograma, e preparo das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão. Destes 5 mL, foram separadas 2 alíquotas em microtubos tipo eppendorfs: 4,5 mL para o hemograma, 0,5 mL para microscopia eletrônica de transmissão.

O hemograma foi realizado na Fazenda da EMBRAPA em laboratório próprio, logo após a coleta. Na alíquota separada para realização da microscopia eletrônica (sangue total) foi adicionada 1 mL de solução de Karnovsky modificado e foi mantida em temperatura de 10°C por 24 horas.

Todos os mini cavalos Puruca se enquadraram nos padrões de normalidade do hemograma descritos na literatura especializada (Grondin e Dewitt, 2010) e foram selecionados para o estudo de microscopia eletrônica de transmissão.

Para atender o objetivo deste trabalho, foi realizada a caracterização e a determinação da morfologia e ultraestrutura das células sanguíneas de mini cavalos Puruca domiciliados na Ilha do Marajó, por meio de processamento de rotina até a etapa de emblocamento no Laboratório de Parasitologia e Biologia Estrutural da Universidade Federal do Pará (UFPA) e a partir das etapas seguintes até a etapa final o material foi processado no Laboratório de Anatomia Microscópica e de Desenvolvimento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). A identificação das células sanguíneas pela microscopia eletrônica de transmissão foi baseada no tamanho, forma, distribuição dos grânulos, na aparência nuclear e presença de organelas citoplasmáticas.

As células sanguíneas foram processadas segundo a metodologia de Alberio (2000). As células sanguíneas que foram fixadas em solução de Karnovsky modificado por 24h a temperatura de 10°C, foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, por 3 vezes. Após as lavagens o material foi centrifugado por 5 minutos, a fim de se obter um sedimento consistente (pellet) o suficiente para que pudesse ser cortado. Posteriormente a centrifugação,

os pellets foram colocados em uma placa de petri e cortados em finos pedaços para a próxima etapa.

A seguir, as amostras foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1M acrescido de 5mM de cloreto de cálcio e 0,8% de ferrocianeto de potássio, por 60 minutos, a 4°C, na ausência de luz. As células foram lavadas uma vez em tampão cacodilato 0,1M, seguida de duas lavagens com água destilada. Em seguida, foi realizada a contrastação em bloco das amostras com acetato de uranila a 2,5% em acetona 50%, por 1 hora, à temperatura de 4° a 10°C.

As amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona: 50%, 70%, 90% - 10 minutos cada passagem. Além dessa série foram feitas mais três passagens em acetona 100%. Após a desidratação, o material foi infiltrado em concentrações crescentes de epon diluído em acetona nas seguintes proporções: 1:3; 1:2; 1:1; 2:1; 3:1 até epon puro com DMP 30. Os tempos entre uma troca e outra variaram de 8 a 12 horas. As células sanguíneas foram incluídas novamente em epon puro com DMP 30 para polimerização a 60%, por um período de 48 horas.

Os blocos foram trimados manualmente com o auxílio de uma lâmina de barbear. Os cortes foram feitos no ultramicrotomo Reichert Ultracult S, com espessura de 70 a 90nm, utilizando navalha de diamante (Diatome®), os cortes foram recolhidos em grades de cobre para microscopia eletrônica de transmissão de 300 a 400 tramas por polegada. O material foi contrastado com acetato de uranila a 5% em água destilada durante 20 minutos (na ausência de luz), seguida por contrastação em citrato de chumbo a 2% em água destilada por 5 minutos. Os cortes foram observados no microscópio eletrônico de transmissão MORGAGNI 268®.

2.3 RESULTADOS

As células sanguíneas observadas foram submetidas a análises qualitativas, destacando as características morfológicas e ultraestruturais. Desta maneira, foram avaliadas características do núcleo, como: forma, tipo de cromatina, presença ou não de nucléolo. Em relação ao citoplasma, foram descritos algumas organelas, como: grânulos, mitocôndrias e complexo de Golgi. Além disso, foi avaliado o diâmetro médio das células.

As hemácias foram identificadas por meio de eletromicrografias panorâmicas, visto que não há ultraestruturas a serem observadas neste tipo celular (Figura 11).

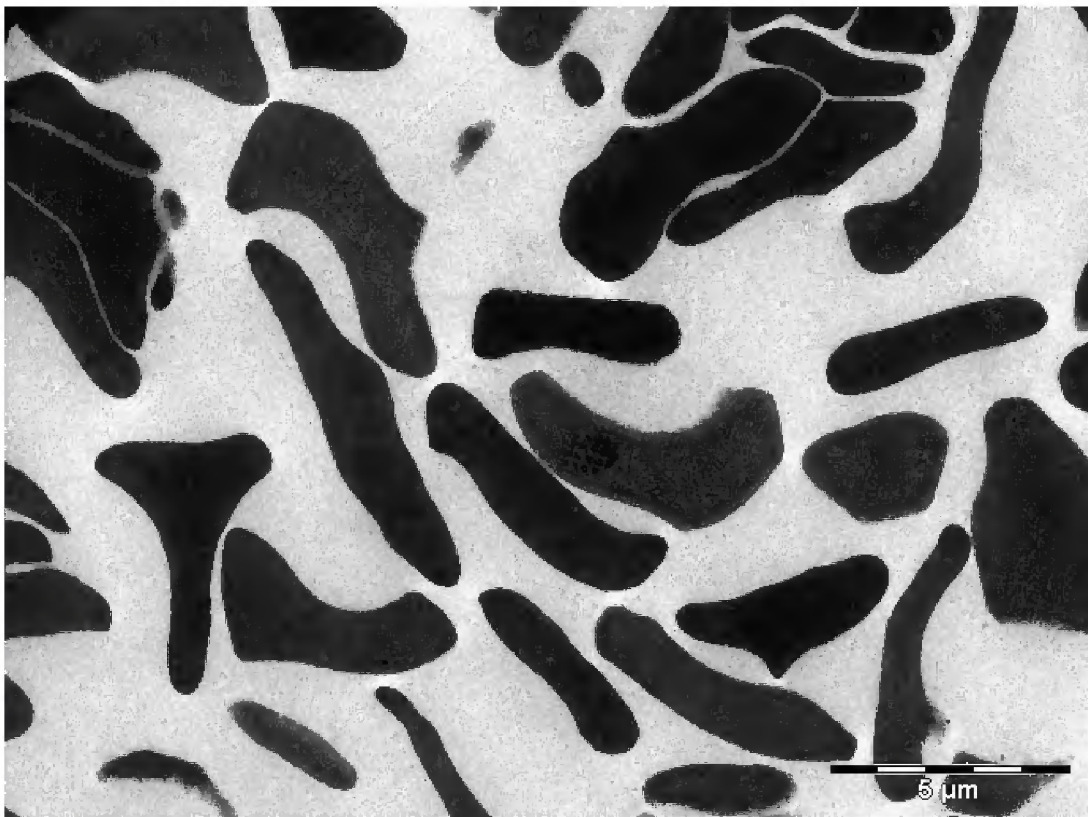


Figura 11 – Eletromicrografia panorâmica de hemácias de mini cavalos Puruca. (Escala de barra = 5 μ m).

Foram identificados todos os tipos de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos) nas amostras observadas. O diâmetro médio dos leucócitos foi de 5,9 μ m. Seus núcleos possuíam diversas formas (irregular, arredondado, ferradura). Foram verificados dois tipos de cromatina (heterocromatina e eucromatina). Os grânulos possuíam características morfológicas diversas (formatos arredondados e alongados) e demonstraram em sua maioria serem eletrodensos.

Os neutrófilos apresentaram ultraestrutura de contorno arredondado, emissão de pequenos pseudópodes na periferia do citoplasma. Diâmetro médio de $6,8\mu\text{m}$. Os lobos nucleares dos neutrófilos apresentaram-se excêntricos e demonstraram áreas maculosas com partes mais ou menos densas, dependendo da quantidade de cromatina condensada. Foram observados tanto neutrófilos bastonetes como segmentados. Além disso, mostraram variável quantidade de grânulos arredondados, complexo de golgi e mitocôndrias ovais dispersas no citoplasma. Foi possível observar ainda, a membrana nuclear interna, externa e ausência de nucléolo. Entretanto, não foi possível observar retículo endoplasmático liso, rugoso e ribossomos. (Figuras 12 e 13).

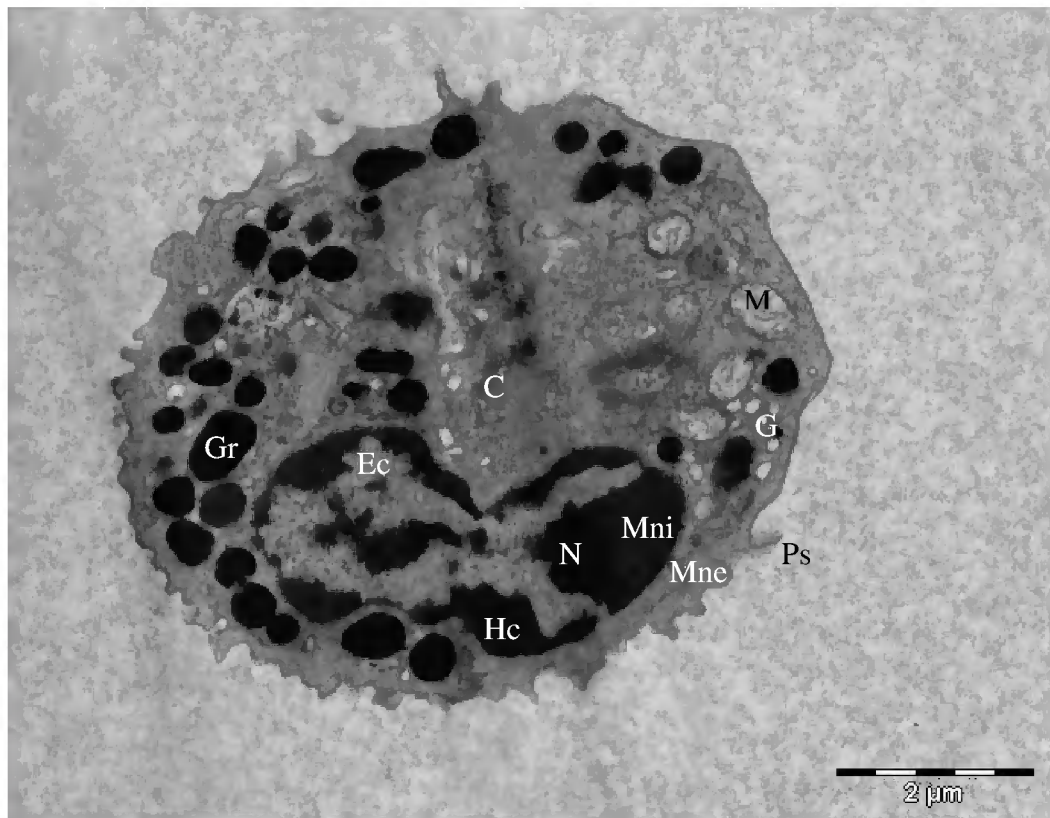


Figura 12 – Eletromicrografia de neutrófilo bastonete do mini cavalo Puruca. (N) Núcleo; (Hc) heterocromatina; (Ec) eucromatina; (Mni) membrana nuclear interna; (Mne) membrana nuclear externa; (C) citoplasma; (G) complexo de golgi; (Gr) grânulo; (M) mitocôndria; (Ps) pseudópodes. (Escala de barra = $2\mu\text{m}$)

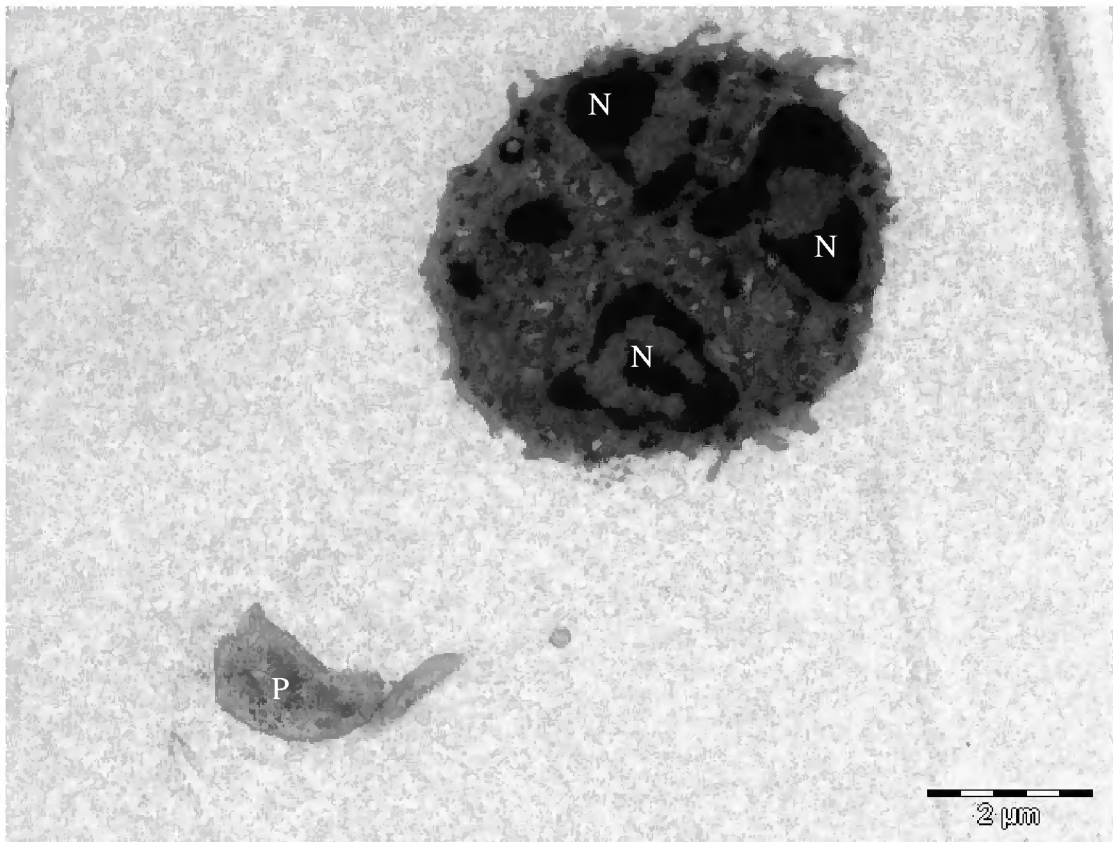


Figura 13 – Eletromicrografia de neutrófilo segmentado do mini cavalo Puruca (acima), (P) plaqueta (abaixo). Observa-se núcleo trilobulado (N). (Escala de barra = 2 μ m).

Os eosinófilos observados apresentaram formato arredondado com projeção de pseudópodes na periferia do citoplasma. Diâmetro médio de $6,4\mu\text{m}$. Núcleo de formato irregular. Além disso, demonstraram a presença de grandes grânulos com formato arredondado, homogêneo, denso, localizados excentricamente, e rodeados por uma matriz menos densa. Além da presença de mitocôndrias ovais e cisternas do complexo de golgi. Não foi possível observar nucléolo, retículo endoplasmático liso, rugoso e ribossomos (Figura 14).

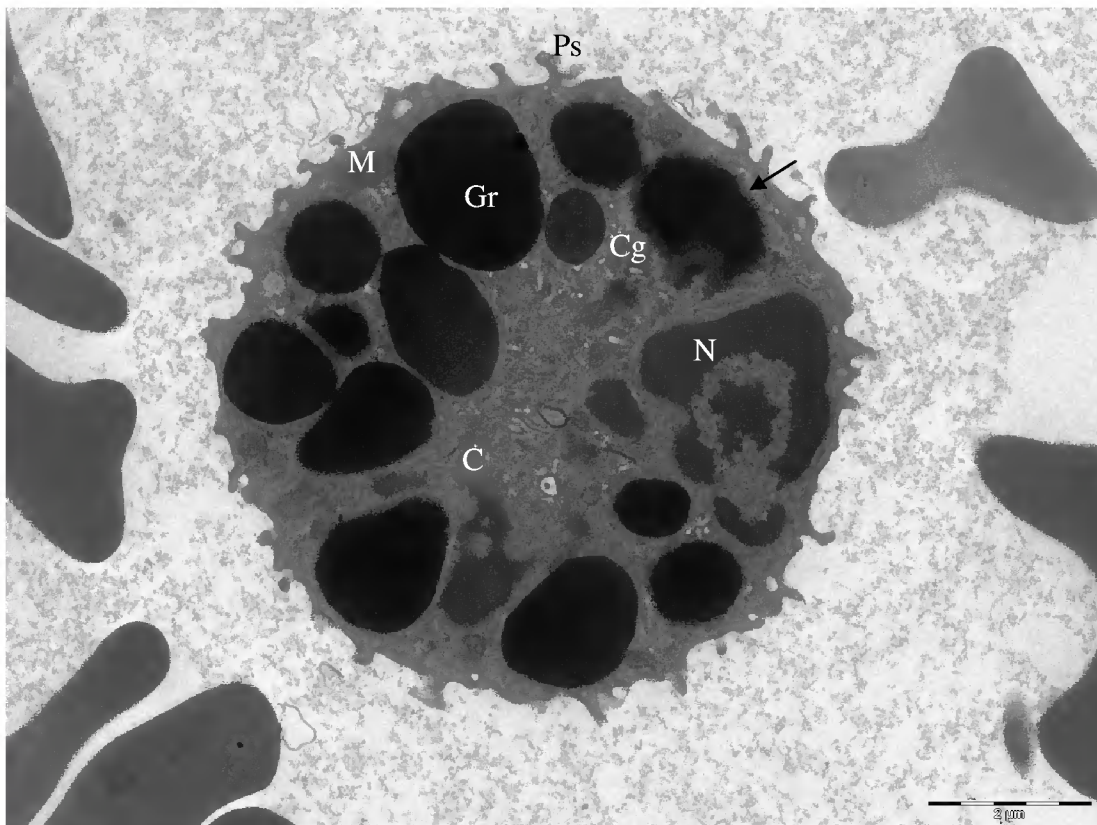


Figura 14 – Eletromicrografia de eosinófilo do mini cavalo Puruca. (N) Núcleo; (C) citoplasma; (M) mitocôndria; (Gr) grânulos; (Cg) cisternas de complexo de golgi; (Ps) pseudópodes. (→) observar grânulo rodeado por uma matriz menos densa. (Escala de barra = $2\mu\text{m}$).

Os basófilos se apresentaram arredondados, apesar das projeções da membrana plasmática observadas, demonstraram a presença de inúmeros grânulos eletrodensos em seu citoplasma, de forma arredondada e alongada. Estes grânulos possivelmente estão mascarando o núcleo. Diâmetro médio de $6.8\mu\text{m}$. Não foram observados núcleo, nucléolo, retículo endoplasmático liso, rugoso e ribossomos (Figura 15).

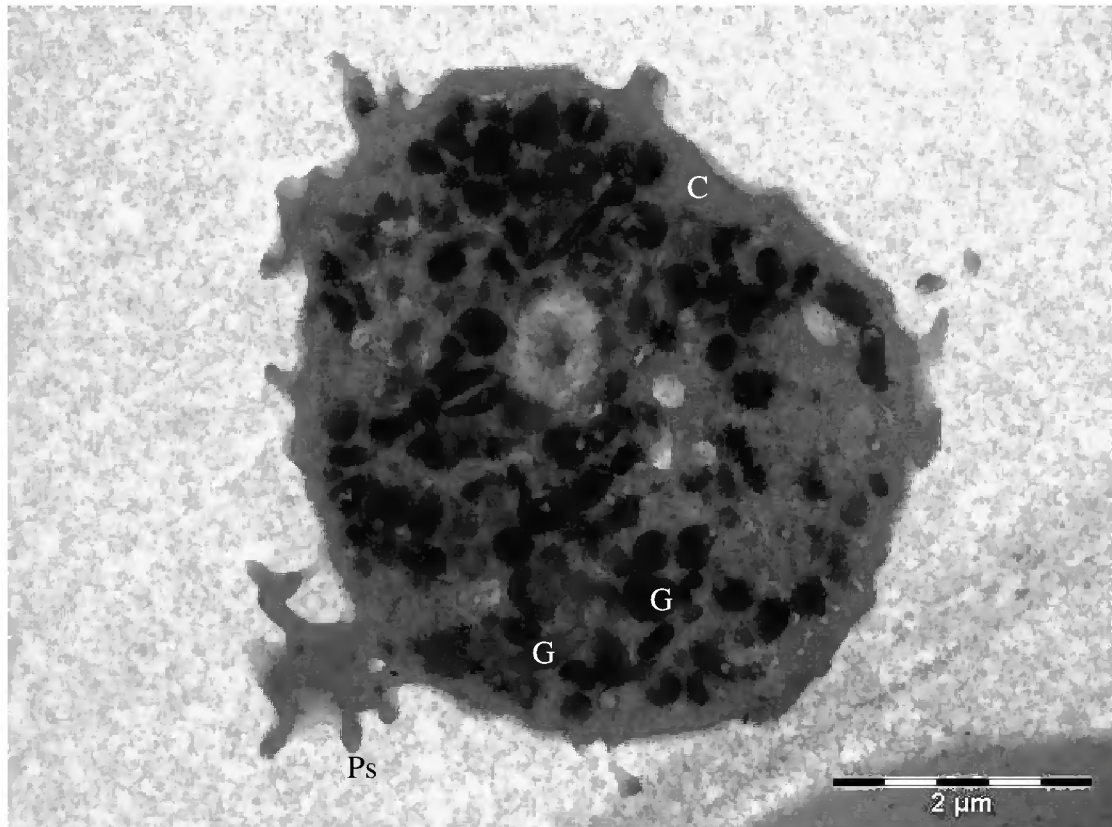


Figura 15 – Eletromicrografia de basófilo do mini cavalo Puruca. (C) Citoplasma; (G) grânulos; (Ps) pseudópodes. (Escala de barra = 2μ).

Os linfócitos avaliados apresentaram núcleo grande, central, arredondado, sendo observada membrana nuclear interna e externa. Foi verificado citoplasma escasso com projeção de pseudópodes. Diâmetro médio de 3,4 μ m. Ausência de nucléolo. Não foi possível a observação do retículo endoplasmático liso, rugoso e ribossomos (Figura 16).

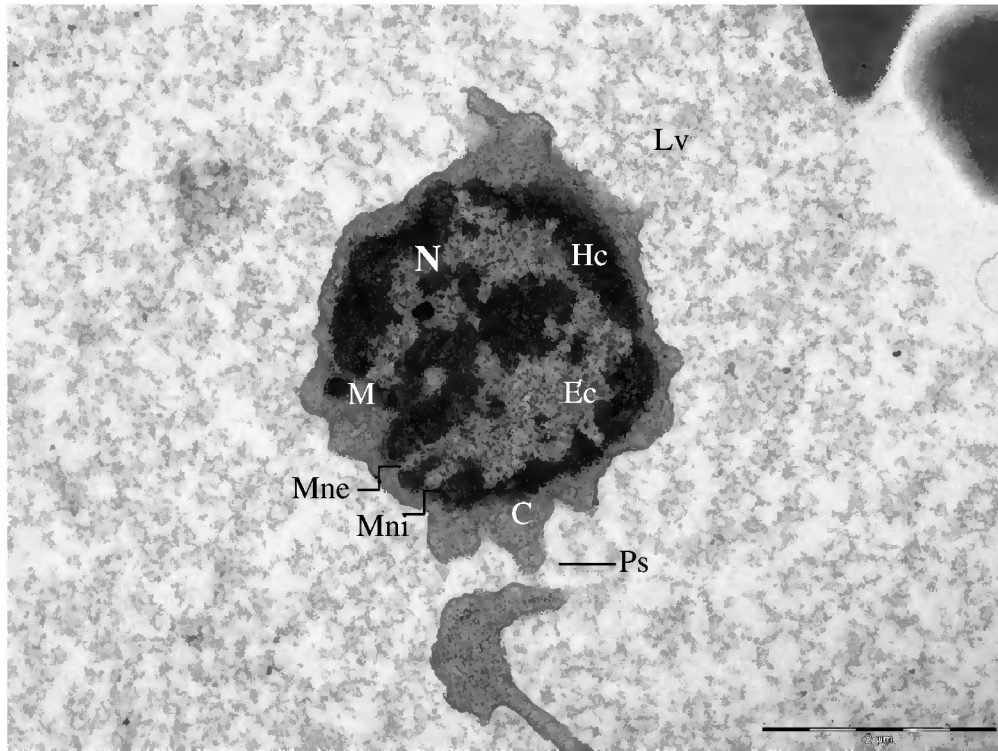


Figura 16 – Eletromicrografia de linfócito do mini cavalo Puruca. (C) Citoplasma; (N) núcleo, (M) mitocôndria; (Hc) heterocromatina; (Ec) eucromatina; (Mne) membrana nuclear externa; (Mni) membrana nuclear interna; (Ps) pseudópodes; (Lv) lúmen vascular. (Escala de barra = 2 μ m).

Os monócitos estudados apresentaram-se arredondados, com discreta projeção de pseudópodes, núcleo em forma de ferradura, sendo possível visualizar a membrana nuclear e poros nucleares. Foi observada a presença de mitocôndrias e cisternas do complexo de Golgi. Diâmetro médio de 6 μ m. Não foi possível observar nucléolo, retículo endoplasmático liso, rugoso e ribossomos (Figura 17).

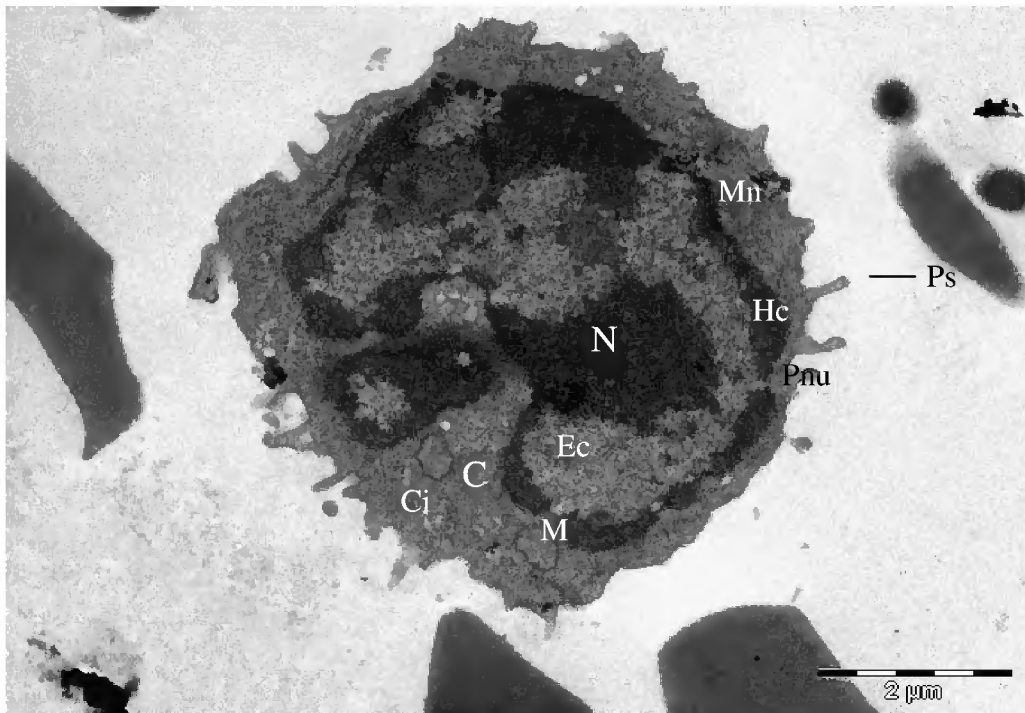


Figura 17 – Eletromicrografia de monócito do mini cavalo Puruca. (N) Núcleo; (C) citoplasma; (M) mitocôndria; (Ec) eucromatina; (Hc) heterocromatina; (Mn) membrana nuclear; (Pnu) poro nuclear; (Ci) cisternas do complexo de golgi; (Ps) pseudópodes. (Escala de barra = 2 μ m).

As plaquetas apresentaram diferentes aspectos morfológicos, caracterizadas por formas irregulares (discóide, lentiforme) e emissão de pseudópodes. Diâmetro médio de 3,2 μ m. Além disso, apresentaram grânulos de glicogênio que foram um achado constante, α – grânulos e plasmalema bem delimitado. Algumas plaquetas apresentaram um sistema canalicular aberto. Não foi observado aparelho de golgi, retículo endoplasmático liso, rugoso e ribossomos (Figura 18 e 19).

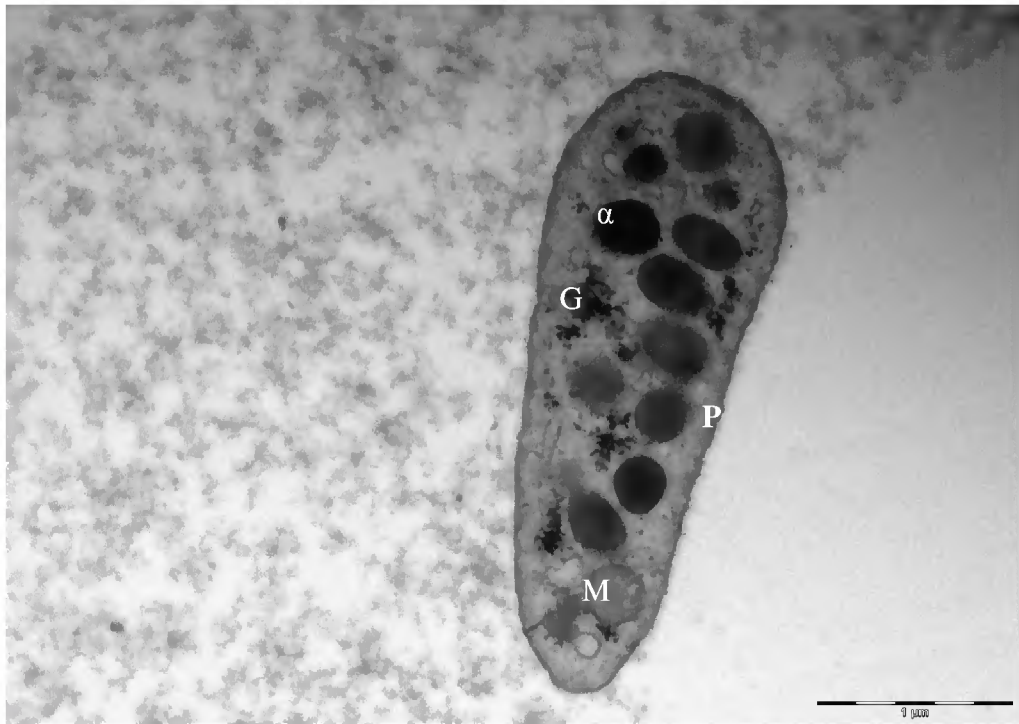


Figura 18 – Eletromicrografia de uma plaqueta normal do mini cavalo Puruca, mostrando presença de grânulos de glicogênio (G), α -grânulos (α), mitocôndria (M) e plasmalema (P). (Escala de barra = 1 μ m).

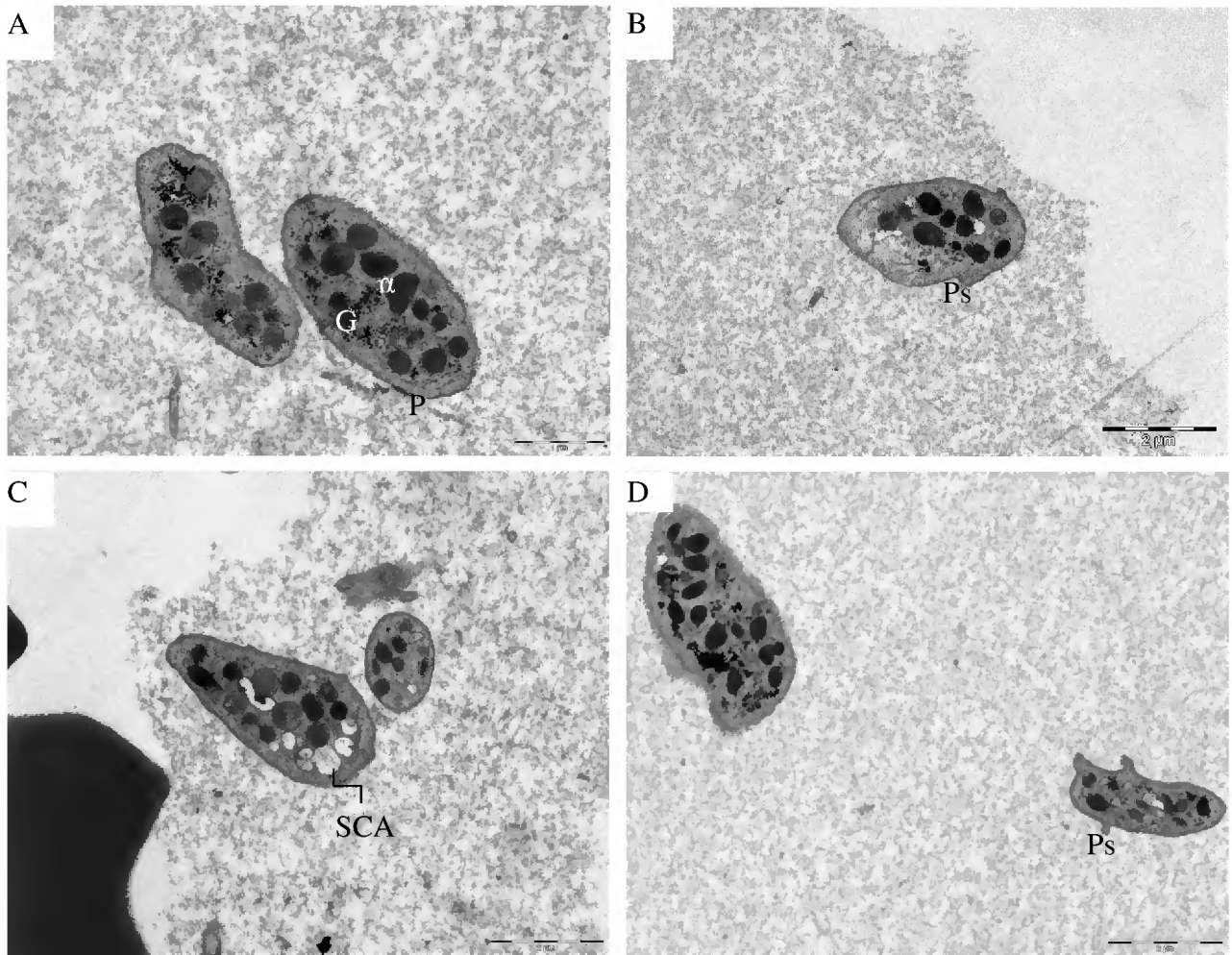


Figura 19 – Eletromicrografia mostrando plaquetas com formas irregulares. (A) Plaqueta apresentando grânulos de glicogênio (G), α -grânulos (α) e plasmalema (P). (B) Plaqueta demonstrando formato ovóide com início de projeção de pseudópodes. (C) Plaqueta de forma lentiforme apresentando sistema canalicular aberto (SCA), plaqueta de forma discóide, típica de plaqueta ativada. (D) Plaqueta demonstrando emissão de pseudópodes (Ps). (Escala de barra = $2\mu\text{m}$).

2.4 DISCUSSÃO

Foram observados todos os tipos celulares sanguíneos dos mini cavalos Puruca através do protocolo padrão adaptado para microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células observadas apresentaram características morfológicas e ultraestruturais compatíveis com a literatura de hematologia para equinos (Steffens III, 1993).

Entretanto, não foi possível estudar as hemácias através da microscopia eletrônica de transmissão, apesar de identificada sua presença nas amostras analisadas. Devido a sua disposição nas eletromicrografias não foi possível aferir o diâmetro médio destas células e nem observar qualquer outra alteração eritrocitária. Sugerindo-se para estudos posteriores a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme trabalho realizado por Pereira, Hatayde e Faria (2011).

Os neutrófilos observados no presente estudo apresentaram ultraestrutura de contorno arredondado e emissão de pequenos pseudópodes na periferia do citoplasma, estando de acordo com observações feitas por Steffens III (1993). Além disso, os neutrófilos estudados apresentaram variável quantidade de grânulos arredondados como demonstraram Jain (1993) e Sonoda e Kobayashi (1966) em seus estudos. Smith (2000) cita ainda que ultraestruturalmente, os neutrófilos maduros são primariamente compostos de heterocromatina e raramente contém nucléolo.

Jain (1993) e Smith (2000), afirmaram ainda que existam pelo menos dois tipos de grânulos nos neutrófilos de mamíferos, azurofílicos (primários) e específicos (secundários), entretanto seria necessária a utilização da técnica de citoquímica para a realização da diferenciação destes grânulos em equinos, devido ao formato bastante semelhante dos grânulos e da sua eletrodensidade, conforme procedeu Alberio (2000) em seu trabalho.

Baggiolini et al. (1985) identificaram em sua pesquisa que os neutrófilos de ruminantes possuem três tipos de grânulos. Rodrigues et al. (2010), também identificaram a presença de três tipos de grânulos (G1, G2 e G3) em neutrófilos de bovinos e esses foram definidos pela sua eletrodensidade e formato. Esses grânulos seriam importantes por conterem enzimas hidrolíticas e substâncias antibactericidas necessária na digestão e morte de microorganismos (Jain, 1993).

Sonoda e Kobayashi (1966) afirmam que a localização dos lobos nucleares dos neutrófilos pode se apresentar em qualquer lugar do citoplasma, mas são geralmente localizadas no centro da célula, entretanto a localização mais comum do núcleo dos neutrófilos deste trabalho foi excêntrico.

Com relação aos eosinófilos, Stockert (2005), afirma que este tipo celular em eqüinos é facilmente reconhecido como elementos individuais na microscopia óptica, e essa característica fazem dessas células modelos adequados para análises citoquímicas e correlações precisas em microscopia eletrônica. Steffens III (1993), completa ainda que por causa da presença de grânulos característicos, os eosinófilos tendem a ser mais facilmente identificados que outros granulócitos em preparações para estudos de ultraestrutura; característica essa confirmada pelo presente estudo.

Na presente pesquisa no qual se trabalhou com sangue total, foi discreta a observação dos basófilos concordando com Kerr (2003) que afirmou que os basófilos são quase sempre encontrados no sangue de cavalos. Steffens III (1993) cita que os basófilos podem ser difíceis de distinguir ultraestruturalmente de outros granulócitos, a não ser que eles ocorram em grande número. Por causa de sua baixa frequência no sangue, os basófilos são infreqüentemente vistos no sangue total, capilares e outros vasos. Jain (1993) refere ainda que basófilos maduros apresentam um padrão de grânulos heterogêneos, o que foi demonstrado neste trabalho.

Jain (1993) relata que o núcleo dos linfócitos tem cromatina grosseiramente condensada e é geralmente arredondado, mas pode ser oval ou com leves reentrâncias. Nucléolo geralmente está ausente (Steffens III, 2000). Tanto em microscopia óptica como eletrônica, o núcleo do linfócito ocupa quase a totalidade do citoplasma (ALBERIO, 2000), e possui menor diâmetro que os neutrófilos (Weiser e Thrall, 2007), informações compatíveis com o referido estudo.

Os monócitos observados em nossa pesquisa apresentaram núcleo em forma de ferradura, citoplasma razoavelmente abundante e projeções na membrana plasmática, corroborando com o estudo de Latimer e Rakich (2002), que citam que o núcleo dos monócitos de eqüinos são variáveis em formato e podem ser oval, bilobulado, formato de ferradura, trilobulado ou irregular. Citoplasma abundante, vacúolos são incomuns e pseudópodes podem ser vistos ao longo da membrana plasmática deste tipo celular.

Não foi possível sua identificação do retículo endoplasmático rugoso, liso e ribossomos nos leucócitos, apesar de diversas literaturas (Steffens III, 1993; Jain, 1993; Rodrigues et al., 2010) citarem a presença dessas organelas citoplasmáticas nos glóbulos brancos.

Os mini cavalos Puruca apresentaram plaquetas com diâmetro médio de 3,2 μm , corroborando com os estudos de Grondin e Dewitt (2010) em afirmam que as plaquetas de eqüinos possuem diâmetro variando de 2,5-3,5 μm . A literatura cita que as plaquetas possuem

estrutura semelhante entre as várias espécies de mamíferos e que a microscopia eletrônica de transmissão revela características únicas deste tipo celular (Jain, 1993).

Possui forma discóide ou alongada (Jain, 1993), suas organelas podem se mostrar mais periféricas ou centrais (Paes Leme et al., 2006) e podem projetar pseudópodes (Jain, 1993; Paes Leme et al., 2006; Zandim et al., 2012). Essa pseudopodia pode ser notada em plaquetas ativadas. Podem ser observados ainda mitocôndrias e grânulos de glicogênio (Paes Leme et al., 2006).

Um achado interessante na presente pesquisa foi a identificação do sistema canalicular aberto (SCA) em algumas plaquetas. Essa estrutura é importante por armazenar grânulos plaquetários e posteriormente esvaziar o conteúdo destes grânulos para o plasma. Esses grânulos armazenam fatores de coagulação, necessários para a estabilização do tampão das plaquetas (Thrall, 2007).

Bastos da Silva et al. (1998), afirmaram que o SCA está ausente em plaquetas de bovinos, o que pode representar a necessidade de mecanismos especiais de absorção e secreção de substâncias por essas células. Paes Leme et al. (2006), em seu trabalho sobre ativação de plaquetas em equinos com laminite induzida e tratada com antiinflamatórios não esteroidais (AINE's), não encontrou SCA nas plaquetas destes animais, o que ele sugeriu ser uma deficiência ou ausência, em desacordo com o presente trabalho.

Zandim et al. (2012) observaram em seu trabalho sobre ativação plaquetária em equinos, que esse fenômeno era caracterizado pela modificação da morfologia das plaquetas (forma discóide) após a ativação das mesmas, com o desenvolvimento de pseudópodes que se estendiam ao tecido lesado. Por tanto, a ativação plaquetária ocorre em ordem de amplificação da resposta inflamatória ao tecido lesado, de maneira que promova uma rápida e efetiva recuperação.

2.5 CONCLUSÃO

- Não foi possível realizar estudos das hemácias dos mini cavalos Puruca através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Sugerindo-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para estudos posteriores;

- Foram identificados todos os tipos celulares sanguíneos dos mini cavalos Puruca, a saber: hemácias, leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos) e plaquetas.

- Este foi o primeiro estudo sobre o tema e a raça em questão no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Monique Araújo Luz, Larissa Seixas, Dinaiara Fragoso, Flávia Matos, Thiago Mangas, Elton Everton, Rosa Rodrigues, Heriberto Figueiredo e Dennis Lima pelo apoio nos trabalhos de campo e laboratório. A EMBRAPA, UFRA, UFPA e FMVZ-USP por disponibilizarem suas instalações para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Alberio SHVO. 2000. **Caracterização ultraestrutural e citoquímica das células sanguíneas da Ameiva Ameiva**. 2000. 65f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas – Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- Baggioloni M, Horisberger U, Gennaro R, Dewald B. 1985. Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. **Laboratory Investigation**, 52: 151-158.
- Bastos da Silva M, Dessy C, Coghe J, David JL, Lekeux P. 1998. Protective effects of WEB 2086 (PAF agonist) and ketoprofen (NSAID) on PAF induced changes in the morphological ultrastructure of blood platelets in calves. **Vet Res Comm**, 22: 273-291.
- Fujimaki Y, Isoda M. 1990. Fine structural study of leucocytes in the goldfish. *Carassius auratus*. **J. Fish. Biol.**, 36: 821-831.
- Grondim TM, Dewitt S. 2010. Normal hematology of the horse and donkey. In: Weiss D, Wardrop KJ. **Shalm's veterinary hematology**. 6 ed. Wiley-Blackwell: USA. 821-828 p.
- Imagawa T, Hashimoto Y, Kitagawa H, Kon N, Kudo N, Sugimura M. 1989. Morphology of bloodcells in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Jpn. J. Vet. Sci.**, 51: 1163-1172.
- Jain NC. 1993. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger. 417 p.
- Kerr MG. 2003. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. São Paulo: Roca. 436 p.
- Latimer KS, Rakich PM. 2002. In: Cowell RL, Tyler RD. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 6 ed. Mosby: St. Louis. 200-216 p.
- Marques JRF, Costa MR, Ohaze MM. Conservação e caracterização de equídeos da ilha de Marajó em estudo no BAGAM. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE “Recursos genéticos: conservar para a vida”, 3, 2001, Londrina, Paraná. **Anais...**
- Paes Leme FO, Wurzinger LJ, Vasconcelos AC. 2006. Ativação de plaquetas de eqüinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 58: 149-157.
- Perreira WAB, Hatayde MR, Faria JLM. 2011. Uso da técnica de microscopia eletrônica de varredura para determinação de alterações eritrocitárias em ovinos intoxicados experimentalmente pelo cobre. **Vet e Zootec.**, 18: 275-283.
- Rodrigues GC, Oliveira LJ, Monteiro JM, Lima AR, Gonçalves PO, Hernandez-Blazquez FJ, Leiser R, Kfoury Júnior JR. 2010. Ultrastructural characterization of bovine umbilical Cord blood cells. **Pesq Vet Bras**, 30: 897-902.
- Smith GS. 2000. Neutrophils. In: Feldman BV, Zinkl JG, Jain NC. **Schalm's veterinary hematology**. 5 th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 281-296 p.

Sonoda M, Kobayashi K. 1966. Electron microscopic observations on the blood of the horse – neutrophils in the peripheral blood of the clinically healthy horses. **Jap. J. Vet. Res.**, 14: 71-85.

Steffens III WL. 1993. Ultrastructural features of leukocytes. In: JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger. 326-335 p.

Stockert JC. 2005. The horse eosinophil as a model leucocyte for morphological and citochemical studies. **Braz. J. Morphol. Sci.**, 22: 73-84.

Teixeira JC. 1995. Condicionamentos históricos e ecológicos do cavalo marajoara. **O cavalo marajoara**, n. 12, p. 13.

Thrall MN. 2007. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca. 582 p.

Weiser G, Thrall MA. Considerações sobre leucócitos e leucogramas. In: Thrall MA. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

Zandim BM, Souza MV, Magalhães PC, Benjamin LA, Maia L, Oliveira AC, Pinto JO, Júnior JIR. 2012. Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesq. Vet. Bras**, 32: 83-92.