

## ERITROCITOS NA RETICULOCITOSE DO SATURNISMO EXPERIMENTAL\*

### ESTRUTURA MITOCONDRIAL

ERYTHROCYTES IN RETICULOCYTOSIS OF EXPERIMENTAL SATURNISM  
MITOCHONDRIAL STRUCTURE

A. VALLEJO-FREIRE e A. BRUNNER JR.

(Laboratório de Virus e Virusterapia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

#### INTRODUÇÃO

Com os recentes aperfeiçoamentos do microscópio eletrônico, é possível atingir um poder de resolução de 7 a 10 Å, ao passo que com a microscopia óptica só em condições ótimas se atingia 2000 Å com luz natural, e 1100 Å com o uso da luz ultravioleta. Este fato trouxe como consequência a necessidade de se proceder a uma revisão das noções já adquiridas sobre a microestrutura dos componentes celulares, para comprovar ou modificar os conhecimentos estabelecidos. Somente após esta revisão é que em muitos casos será possível estudar as relações entre a morfologia e o estado fisiológico celular e surpreender as modificações patológicas intracelulares em seu início.

Cuidados especiais devem ser tomados para que o material biológico não sofra alterações durante a colheita, fixação e preparo final. Artefatos que seriam de somenos importância nos preparados observados ao microscópio óptico passam a ser críticos no exame detalhado das estruturas celulares originais ao microscópio eletrônico.

Em estudos visando a localização de riquetsias e vírus no sangue, encontramos dificuldades para interpretar algumas alterações verificadas nas células sanguíneas, até então mal descritas quando observadas ao microscópio eletrônico. Estes fatos se verificam até mesmo com os glóbulos vermelhos, particularmente quando houver uma reticulocitose mesmo discreta.

Em preparações feitas com sangue hemolisado, precauções especialíssimas devem ser tomadas para não confundir partículas de vírus com aquelas originadas de reticulocitos, glóbulos brancos ou plaquetas alteradas nas manobras feitas durante o preparo do material.

O estudo da ultraestrutura dos corpúsculos observados no interior dos glóbulos vermelhos jovens, conhecidos pela denominação de "substantia granulofilamentosa", tem apresentado dificuldades técnicas que só recentemente

\* Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas, Rio de Janeiro, Brasil.

**Esta página tem uma errata. Para acessá-la,  
vá até o link do Sumário desta edição.**

vêm sendo superadas. Com a microscopia óptica, as formações intra-reticulocitárias eram evidenciadas somente através de artifícios técnicos e métodos de coloração, que davam margem a interpretações as mais diversas quanto à sua origem e natureza.

Desde que se verificou que os elementos citoplasmáticos corados pelo verde Janus B poderiam ser identificados às mitocôndrias, os corpúsculos intracelulares que se coravam por aquêle corante passaram a ser interpretados como sendo mitocôndrias. Com o advento da microscopia de contraste de fase, tais estruturas foram observadas em células vivas, independente do uso de corantes ou qualquer artifício técnico, eliminando assim a possibilidade de que fôsem resultado de artefatos.

Reticulocitos tratados pelo verde Janus B apresentam no seu interior filamentos corados em azul esverdeado, o que induziu os pesquisadores a suspeitar de que estas formações fôsem mitocôndrias ou material delas derivado, sem que houvesse sido possível, pelos métodos ópticos, obter uma segura comprovação morfológica. Vários autores, todavia, suspeitavam de que as estruturas assim evidenciadas eram produtos de artefatos. Dustin (8) supunha que as estruturas intrahemáticas eram devidas à precipitação do ácido ribonucleico durante a secagem, ou aos métodos de fixação e coloração. Kosenow (11) pretendeu ter demonstrado que tanto grânulos como filamentos eram formados pela precipitação de ácido nucleico pelos corantes.

A hemoglobina dos reticulocitos impede evidenciar, no microscópio de fase, qualquer estrutura semelhante às encontradas em outras células. Isto somente é possível com o uso de corantes vitais apropriados, como o verde Janus B e o azul de cresil brilhante. Esta circunstância fêz com que persistissem as dúvidas quanto à preexistência da estrutura da chamada "substância grânulo-filamentosa".

O fato de que os filamentos e grânulos nos reticulocitos hemolisados, após uma secagem parcial, tomam a coloração vermelho-rosa, quando tratados pela fucsina ácida e azul escuro, pela hematoxilina, métodos respectivamente de Altmann e Regaud para evidenciar mitocôndrias, levou a se procurar em definitivo esclarecer se êstes filamentos eram realmente mitocôndrias.

Posteriormente, com auxílio da microscopia eletrônica, a "substância grânulo-filamentosa" foi identificada aos filamentos que somente podem ser evidenciados na sua forma original, se a hemólise fôr executada, observando-se determinadas precauções para evitar a sua alteração ou desintegração (6, 7).

Por meio de secções ultrafinas obtidas de reticulocitos íntegros não hemolisados foi, recentemente, verificado que, tanto os filamentos como os grânulos

intrareticulocitários no sangue de cobaias, apresentavam a microestrutura característica de mitocôndrias, permitindo concluir que a "substantia granulo-filamentosa" deve ser morfológicamente identificada às mitocôndrias (5, 7).

Neste trabalho são apresentadas micrografias de mitocôndrias em eritrócitos de cobaia durante intoxicação aguda pelo chumbo, e observações adicionais a trabalhos anteriores que confirmam a interpretação dada sobre a natureza e estrutura da "substantia granulo-filamentosa", assim como informações sobre a estrutura mitocondrial de eritrócitos na reticulocitose experimental de cobaia submetida à intoxicação aguda pelo chumbo ou sangrias sucessivas.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Cobaias de 350 a 400 g de peso. Sangue obtido por punção cardíaca ou corte da unha das patas posteriores (16).

*Intoxicação pelo chumbo.* — Injeções subcutâneas, diárias de 1 ml de solução aquosa de acetato de chumbo a 1%, durante 3 a 9 dias. Colheita do sangue 3 a 7 dias após a última injeção. Fixação imediata em  $OsO_4$  a 1% em tampão veronal-acetato, isotônico, de pH 7,2-7,4, durante uma hora. Nas preparações de sangue de animais assim tratados, o número de reticulócitos, pelo Giemsa, variou de 6 a 50%. O número de normoblastos era de aproximadamente a décima parte do de reticulócitos; em um caso atingiu 0,6%, em sangue com reticulocitose de 6,2%.

*Anemia por sangrias sucessivas.* — Sangria cardíaca diária de 5 a 7 ml durante 6 dias. Colheita do sangue 3 a 4 dias após a última sangria. O número de reticulócitos variou em torno de 10%. Adicionou-se 1 ml de água destilada a cada um de quatro vidros de relógio, usados nas preparações, e duas gotas de sangue de cobaia com reticulocitose. Cinco, dez, vinte e quarenta segundos após a adição do sangue adicionou-se 1 ml de solução aquosa de  $OsO_4$  a 2%, interrompendo, assim, o processo hemolítico em diversas fases e iniciando a fixação dos glóbulos em  $OsO_4$  a 1%, que se prolongou por uma hora. Algumas gotas foram fixadas também em NaCl a 0,75%, contendo 10% de formol, durante 18 horas. Logo após, lavagem em água destilada e coloração durante 1/2 hora em solução de ácido fosfotúngstico a 1%, de pH 4,0.

*Inclusão e cortes.* — Após a fixação segundo Palade (12), os glóbulos foram lavados em água destilada e, em seguida, desidratados pela série alcoólica. A inclusão foi feita numa mistura de metil e butil metacrilato, contendo um catalizador. As trocas dos meios, nos quais as hemácias eram mantidas, desde a fixação até a inclusão, foram feitas por centrifugações e decantações sucessivas. Os cortes ultrafinos foram preparados com micrótomo Porter-Blum. Nos cortes, os reticulócitos foram identificados de acordo com critério seguido em trabalho anterior (7).

*Hemólise em esfregaço.* — Os esfregaços foram preparados em lâminas cobertas com filme de colódio e, após 10 a 20 horas, hemolisados em NaCl a 0,8% contendo 2,5% de formol, lavados em água destilada, corados durante 5 minutos em solução de ácido fosfotúngstico a 1%, de pH 4,0, lavados em água destilada e secados à temperatura ambiente. Os filmes, contendo os glóbulos hemolisados, foram transferidos para grades metálicas e submetidos ao processo de sombreamento metálico, com Pd.

*Hemólise em suspensão.* — Imediatamente após a sangria, 1 ml de sangue foi adicionado a 20-30 ml de água destilada e, cinco minutos após, adicionados 2 ml de ácido ósmico a 1%. Após cinco minutos, os glóbulos eram centrifugados a 500 r.p.m., para a remoção da hemoglobina, e lavados com água destilada, até que um sobrenadante incolor fôsse obtido. Gôtas da suspensão de estromas lavados eram depositadas sôbre grades metálicas cobertas com um filme de colódio e, após a remoção da água com material absorvente e secagem, os estromas eram metalizados com cromo ou paládio.

As preparações foram examinadas num microscópio eletrônico Siemens tipo UM 100b, a 60 Kv, fotografadas em aumento originais de 7200 x e 15000 x e ampliadas fotograficamente.

#### RESULTADOS

Esfregaços de sangue de cobaia intoxicadas pelo chumbo, hemolisados após fixação por meio de secagem parcial, apresentam reticulocitos contendo grânulos e filamentos de diâmetros em torno de 750 m $\mu$  (Fig. 1 a). Raramente, encontram-se reticulocitos contendo grânulos e filamentos de diâmetro normal, assim considerados os de reticulocitose provocada por sangrias múltiplas.

A estrutura dos reticulocitos é mais facilmente evidenciada do que a das hemácias jovens em casos de anemia provocada por sangrias múltiplas (7), apresentando-se, as membranas e trabéculas mitocondriais, com linhas melhor definidas e contrastadas. O diâmetro médio das mitocôndrias nos cortes ultrafinos atinge a 460 m $\mu$  (mínimo: 180 m $\mu$ ; máximo: 830 m $\mu$ ) (Fig. 2 a). Raramente, as mitocôndrias se apresentam com a microestrutura característica preservada. As alterações mais freqüentes são: mitocôndrias com volume sempre aumentado, delimitadas por uma membrana externa contínua e uma interna da qual se originam as lamelas duplas ou *crístae mitochondriales* (13) e mitocôndrias de volume aumentado ou não, desprovidas da membrana externa limitante.

Nas mitocôndrias de maior diâmetro, a membrana externa, contínua, se encontra acentuadamente distendida, mantendo sômente em alguns trechos a relação espacial normal com fragmentos do que se convencionou chamar membrana interna. Estas mitocôndrias alteradas apresentam uma matriz menos densa aos electrons do que o citoplasma e, na grande maioria, apresentam, no interior, lamelas duplas fragmentadas em maior ou menor grau (Fig. 2 a).

Alguns reticulocitos apresentam sômente mitocôndrias sem qualquer vestígio da membrana limitante externa, e em outros, esta membrana está parcialmente destruída ou sofrendo desintegração progressiva (Fig. 3). Nestes casos, as lamelas duplas podem ainda apresentar a microestrutura caracterís-

tica, notando-se claramente a sua continuidade com a membrana interna. As lamelas intramitocondriais são constituídas por uma estrutura contínua derivada da membrana interna que teria sofrido invaginações mais ou menos periódicas. As mitocôndrias de forma alongada ou filamentosa podem apresentar lamelas duplas que atravessam de um lado para outro toda a largura do organelo, ligando a membrana interna de um lado com o outro, separando a estrutura interna da mitocôndria em vários setores, contendo lamelas, em número variado, que não atingem o lado oposto. A membrana externa, contínua, manteria unidos estes vários setores, envolvendo-os completamente. O espaço interlamelar, nas mitocôndrias desprovidas da membrana externa, está diretamente aberto para o citoplasma e a distância entre as membranas constituintes das lamelas varia de 8 a 19  $m\mu$ , correspondendo aproximadamente, ao que se verifica nas mitocôndrias de reticulocitos de cobaias com anemia por sangria.

Algumas secções de mitocôndrias, principalmente as de menores dimensões e de forma esférica ou ovóide, permitem constatar que as *cristae mitochondriales* podem, às vezes, ser constituídas de tubos, à semelhança de dedos de luva, apresentando, nos cortes perpendiculares, secções circulares. Observam-se restos mitocondriais constituídos de fragmentos de lamelas duplas, envoltas por uma linha descontínua e mal definida, ou situados no interior de uma região apenas ligeiramente mais densa aos electrons do que o citoplasma (Fig. 3), que seriam resíduos das membranas mitocondriais em fase de decomposição.

Freqüentemente, aparecem nos cortes, reticulocitos apresentando formações morfológicamente semelhantes ao retículo endoplasmático. Em uma das secções foi observado que a membrana do estroma do reticulocito se continuava com o interior da célula através do que supomos tratar-se do retículo endoplasmático; há, portanto, a possibilidade da existência, pelo menos temporária, de comunicação entre o meio externo e o sistema de canalículos intrareticulocitários.

Grânulos densos aos electrons são encontrados em eritroblastos, reticulocitos e eritrocitos adultos, no sangue circulante:

- a) agrupados no interior de mitocôndrias, já desintegradas;
- b) agrupados e envolvidos por uma membrana dupla;
- c) agrupados, aparentemente sem membrana limitante, iniciando a dispersão;
- d) dispersos no citoplasma.

## DISCUSSÃO

O reduzido campo de observação do microscópio eletrônico torna difícil localizar reticulocitos do sangue normal, onde se encontram em número extremamente reduzido, principalmente nos cortes. Esta dificuldade pode ser superada provocando-se uma reticulocitose por sangria, como foi feito em trabalhos anteriores (6). Foi possível deste modo obter sangue de cobaias com reticulocitose da ordem de 10%, sem que localizássemos eritroblastos. Além da presença ou ausência de mitocôndrias, a diferenciação entre hemácias adultas e reticulocitos pode ser feita, facilmente, pela maior densidade que apresentam as primeiras, devido à menor concentração da hemoglobina nos reticulocitos. Na intoxicação aguda pelo chumbo, a presença de eritrocitos nucleados ou eritroblastos pode levar à obtenção de preparações nas quais as secções não atingem o núcleo, e, a interpretar como reticulocitos os eritroblastos, o que é possível, levando-se em consideração as dificuldades ainda existentes para se obter regularmente cortes seriados. Ainda neste caso, o eritroblasto apresenta menor densidade do que os reticulocitos, mas em grau que não permite a fácil distinção entre estes e os eritroblastos. Considerando-se que o núcleo nos eritroblastos se localiza aproximadamente no centro da célula, desde que se consiga algumas secções seguidas, torna-se fácil surpreendê-lo. No exame das secções, foram tomadas precauções para escolher cortes de reticulocitos que permitissem afastar a possibilidade de serem confundidos com eritroblastos, selecionando aquelas células que apresentavam cortes em série.

Um dos métodos de preparo do glóbulo vermelho para estudo ao microscópio eletrônico é o da retirada da hemoglobina, a fim de que os electrons possam passar através do estroma, mostrando, no caso particular do reticulocito, elementos estruturais como a chamada "substantia granulo-filamentosa". Esta estrutura se apresentará sob a forma de pequenos discos, mais ou menos individualizados, se a hemólise se processar em suspensão, em água destilada ou solução salina de baixa concentração. Quando a hemólise é feita após uma secagem parcial dos glóbulos, os reticulocitos se apresentam com a estrutura filamentosa, relativamente preservada, devido à secagem prévia que "fixa" aquela estrutura, mas não é suficiente para fixar a hemoglobina que é retirada num meio salino hipotônico. Dêstes filamentos ou bastonetes originam-se os pequenos discos por efeito da hipotonia do meio, quando a hemólise se processa em suspensão, sem secagem prévia (6).

No saturnismo, o diâmetro médio dos grânulos e filamentos de reticulocitos hemolisados em esfregaço é de cerca de três vezes o dos grânulos e filamentos de reticulocitos na anemia por sangrias sucessivas. A mesma relação foi observada quanto ao diâmetro médio das mitocôndrias identificadas nos cortes ultrafinos (7). Esta observação constitui prova complementar à hipótese

formulada em trabalhos anteriores, nos quais se pretendeu identificar, morfológicamente, a chamada "substantia granulo-filamentosa" às mitocôndrias (5, 7).

No que diz respeito às reticulocitoses provocadas por sangrias múltiplas ou por intoxicação aguda pelo chumbo, acreditamos ter evidenciado a estrutura mitocondrial da chamada "substantia granulo-filamentosa". Devemos, no entanto, tendo em vista as observações feitas neste trabalho, considerar que é provável que, em condições normais, os reticulocitos possam ser identificados no sangue sem a presença de estruturas definidas, mas apenas de material constituinte destas estruturas e dispersos nos eritrocitos no curto espaço de tempo que resta para a sua transformação em glóbulo vermelho adulto. Em outras palavras, seriam falsos reticulocitos que poderiam explicar as observações de alguns autores mostrando correlação quantitativa entre corantes vitais e substância grânulo-filamentosa intrahemática. Numa reticulocitose verdadeira, como a que se obtém por simples anemia provocada por sangrias sucessivas, grande quantidade de eritrocitos que perderam o núcleo entram na circulação contendo maior ou menor número de mitocôndrias nos vários estádios de involução. Esta fase deve iniciar-se logo que o núcleo deixa de estar presente, ou mesmo momentos antes, quando o bioquimismo intracelular foi suficientemente alterado para justificar as alterações verificadas no eritroblasto, que levam à perda do núcleo e à progressiva desintegração da estrutura mitocondrial que se verificaria inicialmente pela perda da membrana externa e lise dos elementos intramitocondriais. A ausência da membrana limitante externa nas mitocôndrias de alguns reticulocitos, nos quais todos os demais elementos estão preservados, acompanhados de sucessivas modificações indicativas de um progressivo processo de reabsorção das mitocôndrias ou de suas partes, nos leva a considerar possa ser este o mecanismo normal de evolução do reticulocito para a hemácia adulta, isto é, hemácias sem mitocôndrias e retículo endoplasmático, ou seja, sem "substantia granulo-filamentosa". É difícil distinguir, nos limites deste trabalho, o que ocorreria por conta deste fenômeno, daquilo que poderia ser devido ao saturnismo. Esta discriminação seria viável, não fossem as conhecidas dificuldades de melhor observação de detalhes estruturais em reticulocitos de animais normais ou com anemia por sangria.

O aspecto das mitocôndrias (Fig. 3), desprovidas da membrana externa, nas quais se observa nitidamente a continuidade das lamelas duplas com a membrana limitante interna, corrobora a interpretação dada por Palade (13) e não apóia o esquema inicialmente apresentado por Sjöstrand (15), referente à organização estrutural das mitocôndrias, segundo o qual as membranas constituintes das lamelas não se continuam com a membrana limitante interna, isto é, haveria estruturalmente uma independência entre os dois componentes

mitocondriais. Todavia, é preciso considerar a possibilidade da existência de diferentes particularidades estruturais em mitocôndrias de células de tipos diversos.

O melhor contraste observado nas estruturas das mitocôndrias dos reticulócitos no saturnismo, quando examinados no microscópio eletrônico, poderia ser atribuído ao aumento de volume sofrido por aqueles organelos, porém o mesmo se verifica com as mitocôndrias que não sofreram aumento aparente. O chumbo, presente no plasma, contribuiria para a preservação das estruturas "in vivo" ou penetraria nas hemácias durante o processo de fixação, juntamente com o tampão e o ácido ósmico, localizando-se de preferência nas membranas, contribuindo para aumentar o contraste e atuando como um corante adicional ao ácido ósmico. Aub, Fairhall, Minot e Reznikoff (1) mostraram que o chumbo, combinando-se provavelmente com fosfatos do plasma, posteriormente se precipita sobre a membrana dos glóbulos vermelhos, alterando suas propriedades, ou, poderia ainda, penetrar na célula e reagir sobre constituintes outros, excluída a hemoglobina. Cabe ainda considerar a possibilidade de o chumbo, penetrando nos reticulócitos, "fixar" seus constituintes vitais como as mitocôndrias, impedindo o processo de evolução normal da célula à hemácia adulta. Neste caso, a população de reticulócitos circulantes seria constituída de reticulócitos fixados ou estabilizados em várias de suas fases de evolução para o glóbulo vermelho adulto, e de elementos jovens continuamente lançados na circulação e que sofreriam a mesma ação do material tóxico circulante no plasma.

O aumento de volume das mitocôndrias de reticulócitos e as alterações microestruturais observadas no saturnismo (Fig. 2a) são muito semelhantes ao que observamos nos reticulócitos de casos de anemia por sangrias múltiplas submetidos à ação de um meio hipotônico, "in vitro" (Fig. 6). Hemácias normais colocadas num meio isotônico contendo cloreto de chumbo sofrem um aumento de volume e, após um certo tempo, o seu peso específico passa a ser significativamente maior (1).

Devido à falta de mais completos dados experimentais sobre as alterações que se processam no sangue de animais intoxicados pelo chumbo, não é possível interpretar seguramente o mecanismo que leva ao aumento de volume sofrido pelas mitocôndrias. Suspeitando-se, porém, que o aumento de volume possa ser conseqüência de alterações osmóticas ocorridas durante a intoxicação, foram feitas preparações de reticulócitos de cobaias com anemia por sangrias sucessivas, fixadas nas várias fases do processo osmótico, 5, 10, 20 e 40 segundos após a adição dos glóbulos à água destilada, para comparação. Em tôdas estas preparações foram observadas hemácias nas várias fases de hemólise.

Na mitocôndria da fig. 6, a membrana interna acompanhou a externa, possivelmente devido à atuação de fatores de ordem físico-química. As regiões das extremidades e as compreendidas entre os estrangulamentos corresponderiam às formas circulares no interior de reticulocitos hemolisados em suspensão em água destilada (Fig. 7). Os pontos de estrangulamento corresponderiam, provavelmente, às lamelas duplas, que se dispõem em todo o diâmetro da mitocôndria, as quais ofereceria resistência ao aumento de diâmetro naqueles pontos, até o momento em que a membrana das lamelas se rompesse. Assim, quando de um filamento se originam várias formas circulares, estas terão uma ruptura, a qual corresponderia à da membrana limitante externa da mitocôndria. As mitocôndrias das figs. 8 e 9 apresentam o sistema de lamelas no centro, o que indica que a membrana limitante interna não acompanhou a limitante externa ou, no caso de tê-la acompanhado, sofreu rupturas. Esta conclusão tem fundamento no conhecimento das relações estruturais das lamelas duplas com a membrana interna. Pode-se deduzir destas observações que a membrana limitante externa é o componente mitocondrial que confere ao organelo a propriedade de responder às variações de pressão osmótica do meio, atuando à semelhança de um osmômetro.

O retículo endoplasmático, em alguns reticulocitos, parece bem desenvolvido, possivelmente nos mais jovens. O sistema de canalículos, observado por meio de cortes ultrafinos, se assemelha ao retículo endoplasmático de outras células. A observação de estruturas ou de resíduos estruturais de retículo endoplasmático nos reticulocitos foi difícil ou pelo menos muito rara nas várias centenas de preparações de cortes analisados ao microscópio eletrônico. Os filamentos mais finos, descritos em reticulocitos hemolisados, após secagem parcial em esfregaço (6), provavelmente correspondem àqueles canalículos.

A observação de que o retículo endoplasmático se continua com a membrana do estroma do reticulocito pode ter importância no estudo da mecânica de processos fisiológicos e parasitológicos em normoblastos e reticulocitos. O estudo do normoblasto na fase em que se dá a extrusão do seu núcleo, como já foi observado (2), se justifica, desde que a comunicação da membrana citoplasmática com o retículo endoplasmático e a deste com a membrana nuclear externa foi observada em leucócitos (14). Em células de tumor ascítico de Ehrlich, partículas identificadas como sendo do vírus Anopheles A, foram observadas no retículo endoplasmático (9). Esta observação pode sugerir que os pontos de penetração do parasita na célula sejam os de comunicação do retículo endoplasmático com o meio externo. Seria de interesse, neste particular, o estudo de reticulocitos de animais com impaludismo experimental, pois é conhecida a afinidade de várias espécies de *Plasmodium* pelos reticulocitos.

Os grânulos densos aos electrons, que localizamos geralmente agrupados em normoblastos, reticulocitos e hemácias maduras, se assemelham aos descritos por Hoffman, Hillier, Wolman e Parpart (10) em estromas de eritrocitos normais e anormais. Êstes autores, entretanto, não conseguiram localizá-los em casos de intoxicação pelo chumbo. As observações feitas a êste respeito no decorrer dêste trabalho, quanto aos grânulos encontrados em normoblastos, reticulocitos e eritrocitos, confirmam os trabalhos de Bessis e Breton-Gorius (3, 4) sôbre o saturnismo experimental em rato, principalmente em células da medula. Segundo êstes autores, aquêles grãos seriam de ferritina.

#### RESUMO

Eritrocitos de cobaias intoxicadas pelo acetato de chumbo foram examinados no microscópio eletrônico, especialmente a ultraestrutura das mitocôndrias dos reticulocitos. Foi confirmada a identidade da chamada "substantia granulo-filamentosa" com as mitocôndrias. No saturnismo experimental, constatou-se aumento de volume ou tumefação das mitocôndrias que atinge em média 3 vêzes o que se observa em reticulocitos de anemia por sangrias sucessivas. Alterações de tipo semelhante foram obtidas submetendo a variações osmóticas reticulocitos de sangue de cobaias com reticulocitose conseguida por meio de sangrias sucessivas. Em alguns reticulocitos foi possível surpreender a progressiva desintegração da estrutura mitocondrial a partir da perda da membrana externa seguida de sucessiva dissolução dos demais elementos constituintes da mitocôndria, aspectos êstes que foram considerados como representando o mecanismo natural de desintegração das mitocôndrias nos eritrocitos, desde a fase de eritroblasto até a de hemácia adulta.

#### SUMMARY

Erythrocytes of guinea pigs with saturnism induced by lead acetate were examined in the electron microscope, with special reference to the ultrastructure of mitochondria of reticulocytes. The identity of the so-called "substantia granulo-filamentosa" with mitochondria was confirmed. The increase of volume or tumefaction of mitochondria was found to be on an average 3 times greater than the one observed in reticulocytes from bleeding anemia. Similar changes were obtained by means of osmotic variations "in vitro" in reticulocytes from guinea pigs with reticulocytosis provoked by successive bleedings. In some reticulocytes the progressive disintegration of the mitochondrial structure could be observed beginning from the loss of the external membrane followed by successive dissolution of the other constituting elements of the mi-

tochondria; these aspects are held to represent the natural mechanism of the disintegration of mitochondria in erythrocytes, from the stage of the erythroblast to the adult red cell.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Aub, J. C., Fairhall, L. T., Minot, A. S. & Reznikoff, P. — Lead poisoning, *Medicine*, 4: 1-250, 1925.
2. Bessis, M. — *Traité de Cytologie Sanguine*. Edit. par Masson et Cie., p. 218, 1954.
3. Bessis, M. & Breton-Gorius, J. — Étude au microscope électronique des granulations ferrugineuses des érythrocytes normaux et pathologiques, *Rev. Hémat.*, 12: 43-63, 1957.
4. Bessis, M. & Breton-Gorius, J. — Accumulation de granules ferrugineux dans les mitochondries des érythroblastes, *C. R. Acad. Sc.*, 244: 2846-2847, 1957.
5. Braunsteiner, H., Fellingner, K. & Pakesch, F. — Über die Struktur der Retikulozyten, *Acta haemat.*, 16: 322-328, 1956.
6. Brunner, A. Jr. & Vallejo-Freire, A. — Electron microscopic observations on granules and filaments (reticulosomes) of reticulocytes, *Exptl. Cell Res.*, 10: 55-62, 1956.
7. Brunner, A. Jr., Vallejo-Freire, A. & Souza Santos, P. — Electron microscopy of thin sections of reticulocytes, *Experientia*, 12: 255, 1956.
8. Dustin, P. Jr. — Ribonucleic acid and the vital staining of cytoplasmic vacuoles in animal cells, *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, 1: 114-126, 1947.
9. Friedlander, M., Moore, D. H. & Koprowski, H. — Studies with the electron microscope of virus-host relationships in Ehrlich ascites tumor cells. II — The localization and possible development of Anopheles A virus within the endoplasmic reticulum of the host cell, *J. Exptl. Med.*, 102: 317-378, 1955.
10. Hoffman, J. F., Hillier, J., Wolman, I. J. & Parpart, A. K. — New high density particles in certain normal and abnormal erythrocytes, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 17: 245-252, 1956.
11. Kosenow, W. — Über den Strukturwandel der basophilen Substanz junger Erythrozyten im Fluoreszenzmikroskop, *Acta Haem.*, 7: 360-368, 1952.
12. Palade, G. E. — A study of fixation for electron microscopy, *J. Exptl. Med.*, 95: 285-297, 1952.
13. Palade, G. E. — The fine structure of mitochondria. An electron microscope study, *J. Histochem. Cytochem.*, 1: 188-211, 1953.
14. Palade, G. E. — Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 567-582, 1955.
15. Sjöstrand, F. S. — The ultrastructure of mitochondria. Symp. VIIIth Congr. Cell Biol., Leiden, 1954. International Union of Biological Sciences, Series B, nr. 21, Noordhoff Ltd., pp. 16-30, 1955.
16. Vallejo-Freire, A. — A simple technique for repeated collection of blood samples from guinea-pigs, *Science*, 114: 524-525, 1951.

FIGS. 1 — Reticulocitos hemolisados após secagem parcial, em solução salina (0,8%) formalada (2,5%). Corados 5 minutos com ácido fosfotúngstico 1% (pH 4,0). Esta técnica evita a desintegração das mitocôndrias.

- a) Saturnismo. Filamentos (m) com diâmetros de cerca de 750  $m\mu$  e retículo endoplasmático (re).
- b) Anemia por sangria. Filamentos (m) com diâmetros de cerca de 230  $m\mu$ .

FIGS. 1 — Reticuloocytes hemolysed after partial drying, in saline (0.8%) with formalin (2.5%); stained 5 minutes in 1% phosphotungstic acid solution (pH 4.0). This technique avoids disintegration of the mitochondria.

- a) Saturnism. Filaments (m) of about 750  $m\mu$  in diameter, and endoplasmic reticulum (re).
- b) Bleeding anemia. Filaments (m) with diameters near 230  $m\mu$ .

FIGS. 2 — Cortes de reticulocitos fixados imediatamente após a colheita, em ácido ósmico 1% em tampão veronal-acetato, pH 7,2, isotônico, durante 1 hora.

- a) Saturnismo. Mitocôndrias com diâmetros ao redor de 800  $m\mu$ , delimitadas pelas membranas interna e externa (md = membrana dupla). A seta (1) indica uma lamela parcialmente destruída. A maioria das lamelas está desintegrada, podendo ver-se ainda na periferia resíduos de "cristae mitochondriales".
- b) Anemia por sangria. Corte de mitocôndrias em várias direções ( $m_1$ ,  $m_2$ ) e inclusive transversalmente ( $m_3$ ). Mitocôndrias com grande número de lamelas duplas preservadas. Os maiores diâmetros são de aproximadamente 170  $m\mu$ . Nos reticulocitos de anemia por sangria a observação das mitocôndrias é mais difícil do que nos de casos de saturnismo, onde o contraste das estruturas é maior.

FIGS. 2 — Sections of reticuloocytes fixed after bleeding, with 1% osmium tetroxide in isotonic acetate-veronal buffer (pH 7.2).

- a) Saturnism. Mitochondria of about 800  $m\mu$  in diameter. Internal and external membranes (md). Arrow (1) points to a partially destroyed lamella. Most lamellae are disintegrated; traces of "cristae mitochondriales" can be seen at the periphery.
- b) Bleeding anemia. Mitochondria cut in various planes ( $m_1$ ,  $m_2$ ), one being transverse ( $m_3$ ). Preserved lamellae are visible. The largest diameters correspond to the range of 170  $m\mu$ . Due to the poor contrasts, these mitochondria are more difficult to be observed than those of saturnism.

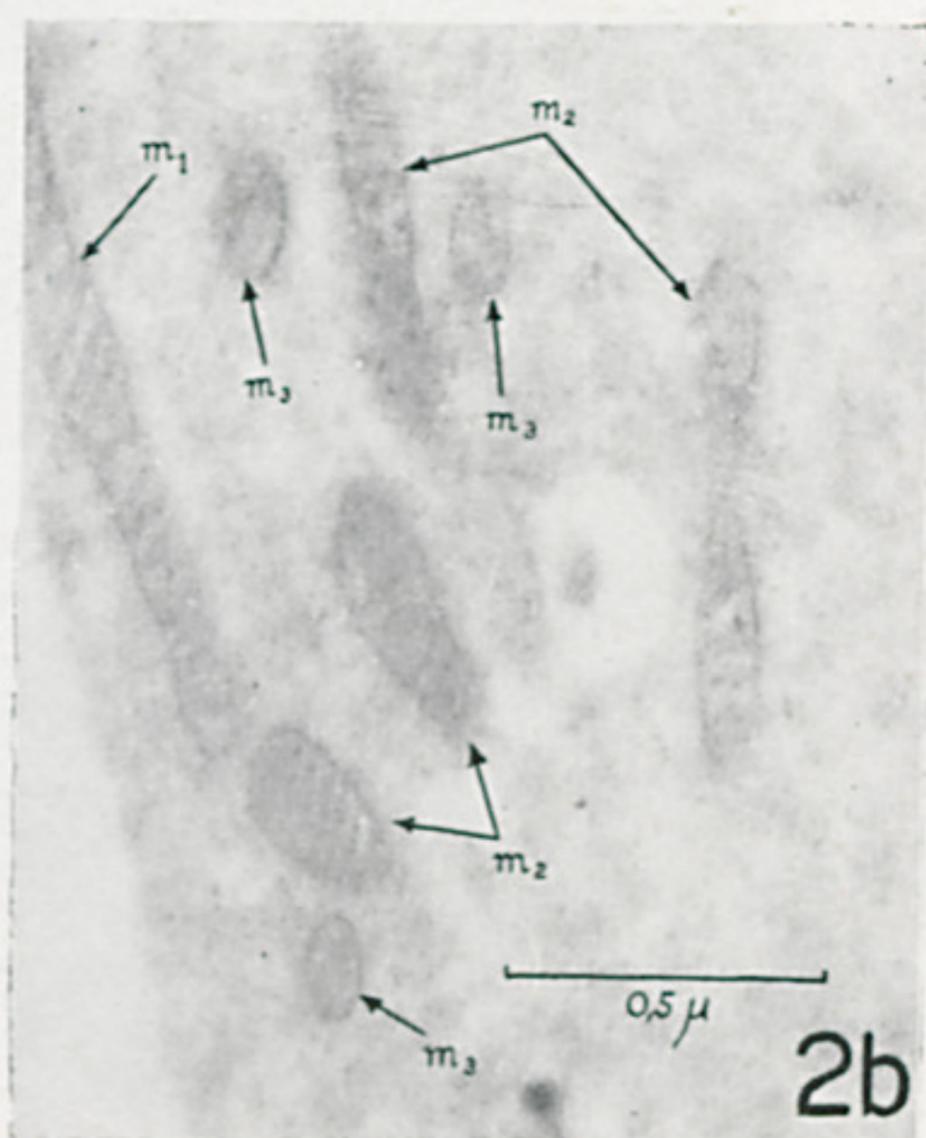
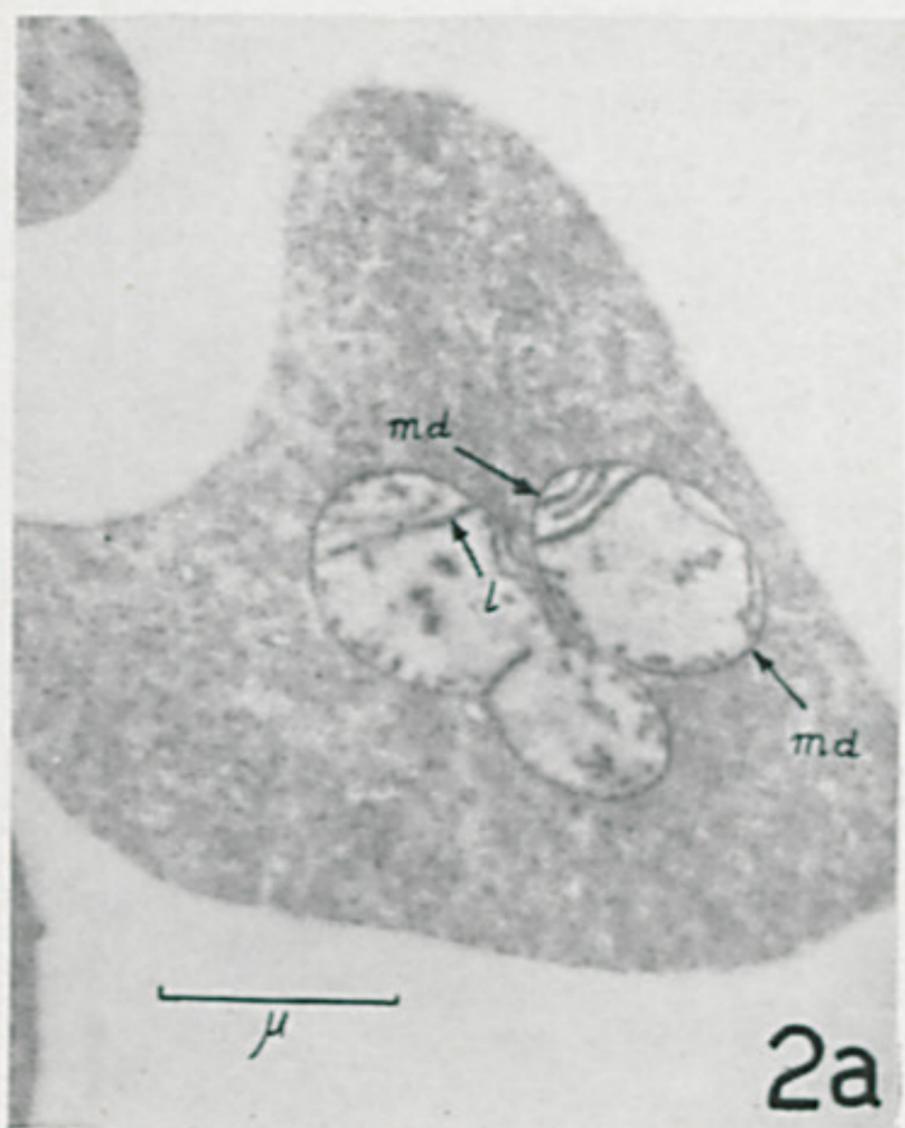
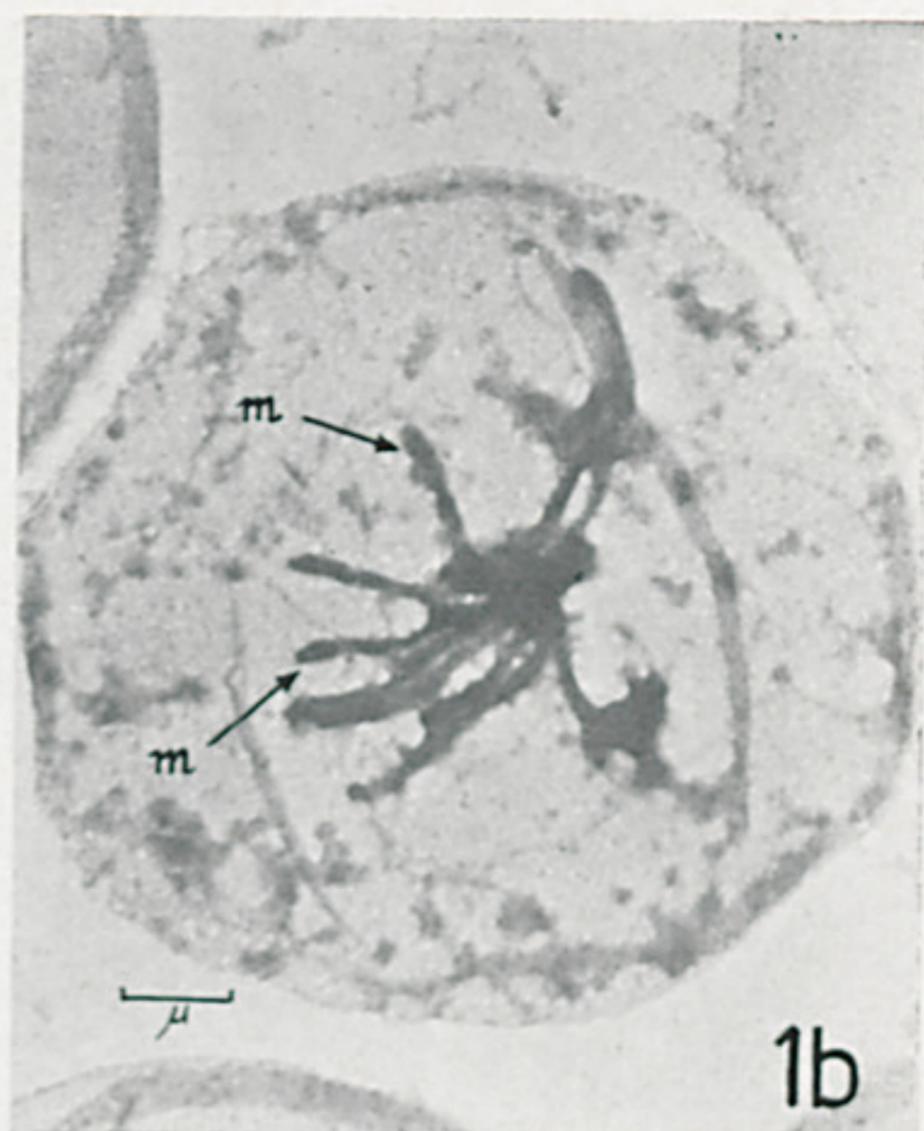
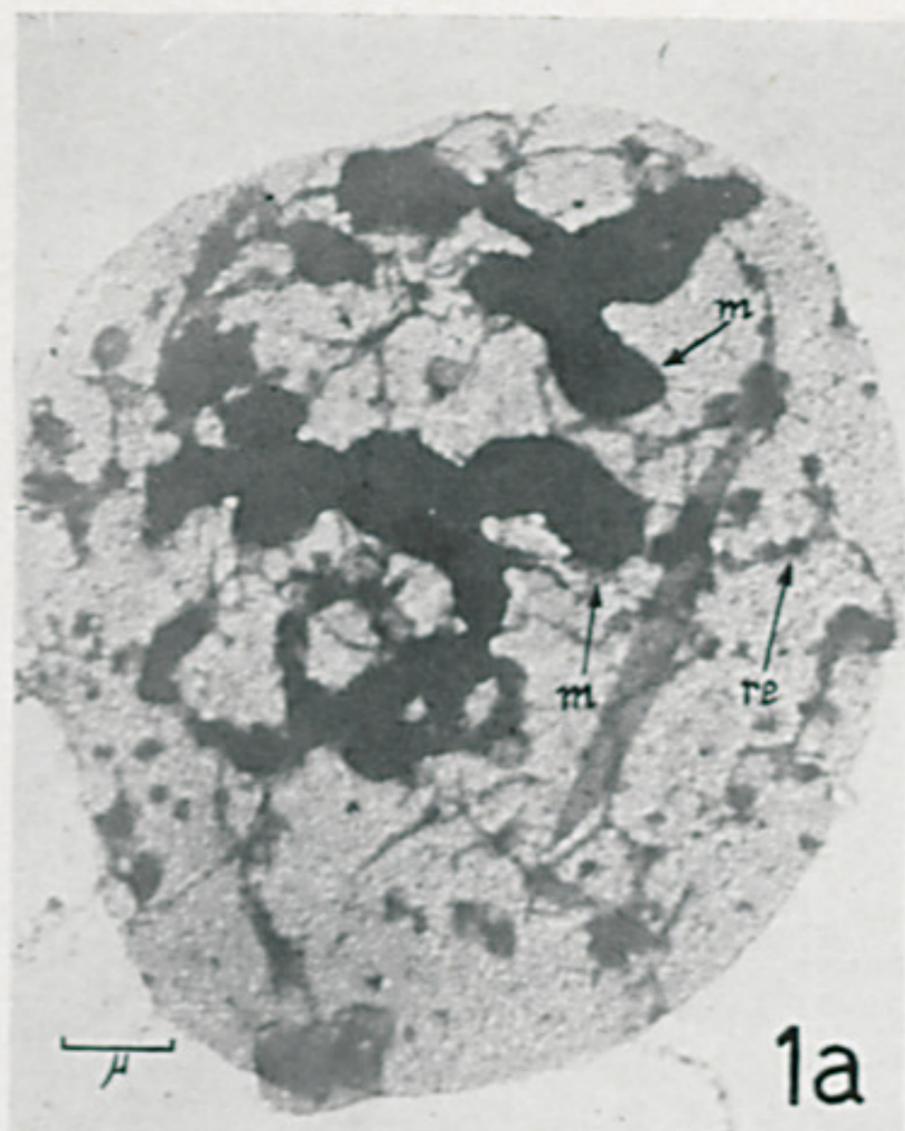
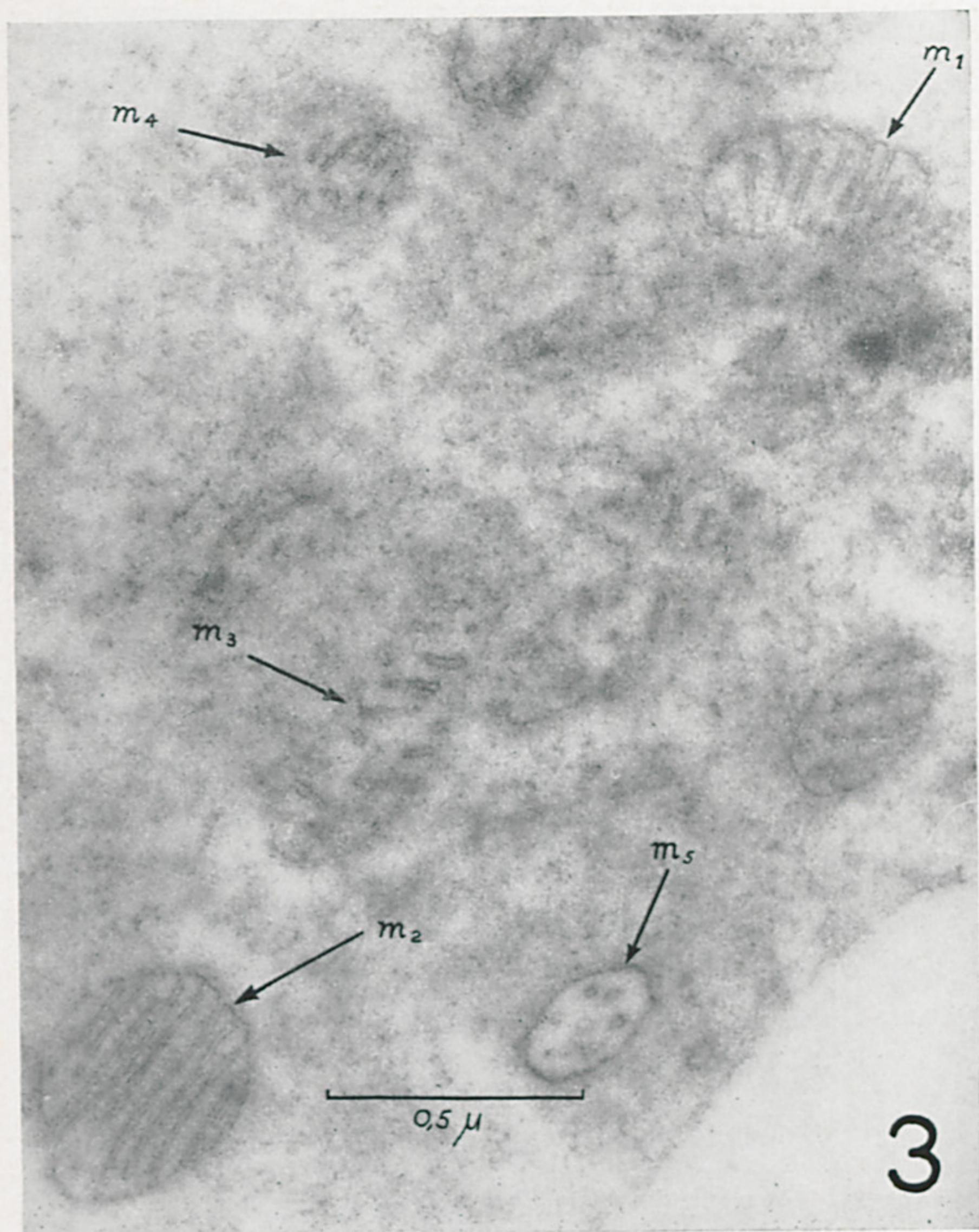


FIG. 3 — Saturnismo. Corte de reticulocito. Mitocôndrias ( $m_1$  e  $m_2$ ) sem membrana externa. Lamelas ou trabéculas mitocondriais constituídas de simples invaginações da membrana interna que se abrem diretamente para o citoplasma. Da mitocôndria  $m_3$  restam algumas lamelas duplas. A mitocôndria  $m_4$  contém também lamelas duplas, envoltas por uma região ligeiramente mais densa aos electrons. É possível que estes aspectos correspondam às fases de reabsorção das mitocôndrias durante o processo de maturação do reticulocito. Mitocôndria  $m_5$  com trabéculas cortadas transversalmente.

FIG. 3 — Saturnism. Section of reticulocyte. Mitochondria ( $m_1$  and  $m_2$ ) without external membrane. The mitochondrial lamellae consist of simple invaginations of the internal membrane which are directly opened towards the cytoplasm. Of mitochondrion  $m_3$  remain some double lamellae. Mitochondrion  $m_4$  contains double lamellae which are surrounded by a slightly more electron dense zone. These aspects possibly correspond to reabsorption stages of mitochondria during the maturation process of the reticulocyte. Mitochondria  $m_5$  with tubular trabeculae cut in a transversal plane.



FIGS. 4 e 5 — Saturnismo. Mitocôndrias ( $m_1$ ) de volume aumentado, menos densas aos electrons que o citoplasma, contendo algumas lamelas duplas não distendidas. No bordo de uma das mitocôndrias pode-se notar uma zona mais densa aos electrons, provavelmente lamelas duplas desintegradas. As mitocôndrias  $m_2$ , de densidade aproximadamente igual à do citoplasma, apresentam lamelas duplas mais ou menos regularmente dispostas. Nestas electromicrografias, coexistem dois aspectos das mitocôndrias que foram interpretados da seguinte maneira: as mitocôndrias  $m_1$  sofreram forte aumento de volume devido à existência da membrana externa durante o processo; as  $m_2$ , que estariam em fase mais avançada de involução, não sofreram aumento considerável de volume, possivelmente, porque não possuíam a membrana externa.

FIGS. 4 and 5 — Saturnism. Mitochondria ( $m_1$ ) of increased volumes and less electron density than the cytoplasm, containing some double lamellae which are not distended. At the border of one of the mitochondria there can be noticed a more electron dense zone, probably disintegrated lamellae. Mitochondria  $m_2$ , which have approximately the same electron density as the cytoplasm, show regularly disposed double lamellae. The two coexisting mitochondrial aspects of these electron micrographs were interpreted as follows: the volumes of mitochondria  $m_1$  were remarkably increased due to the existence of the external membranes; mitochondria  $m_2$ , which presumably are in a more advanced involution stage, did not suffer any noticeable increase in volume possibly because they had no external membranes.

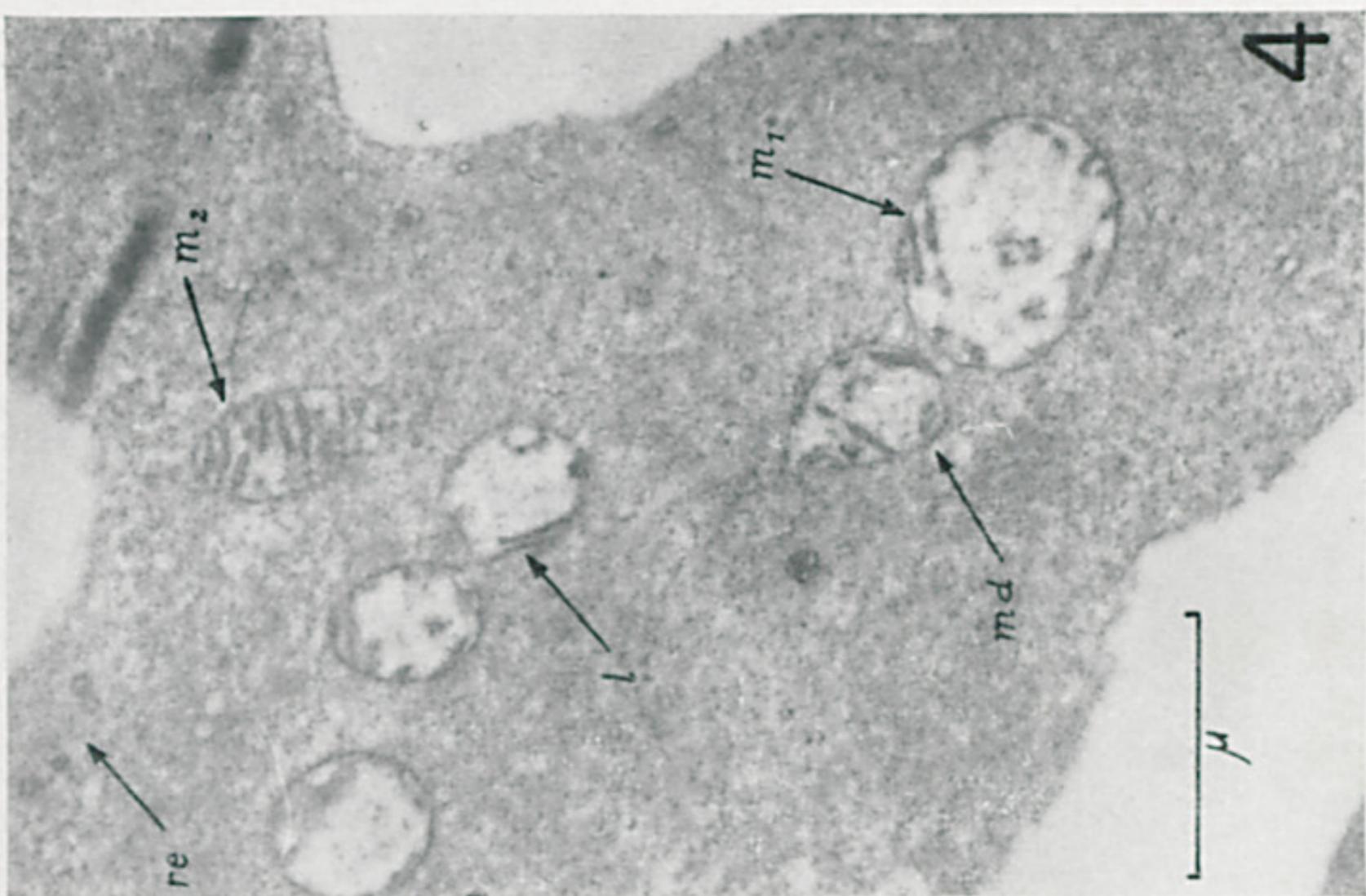
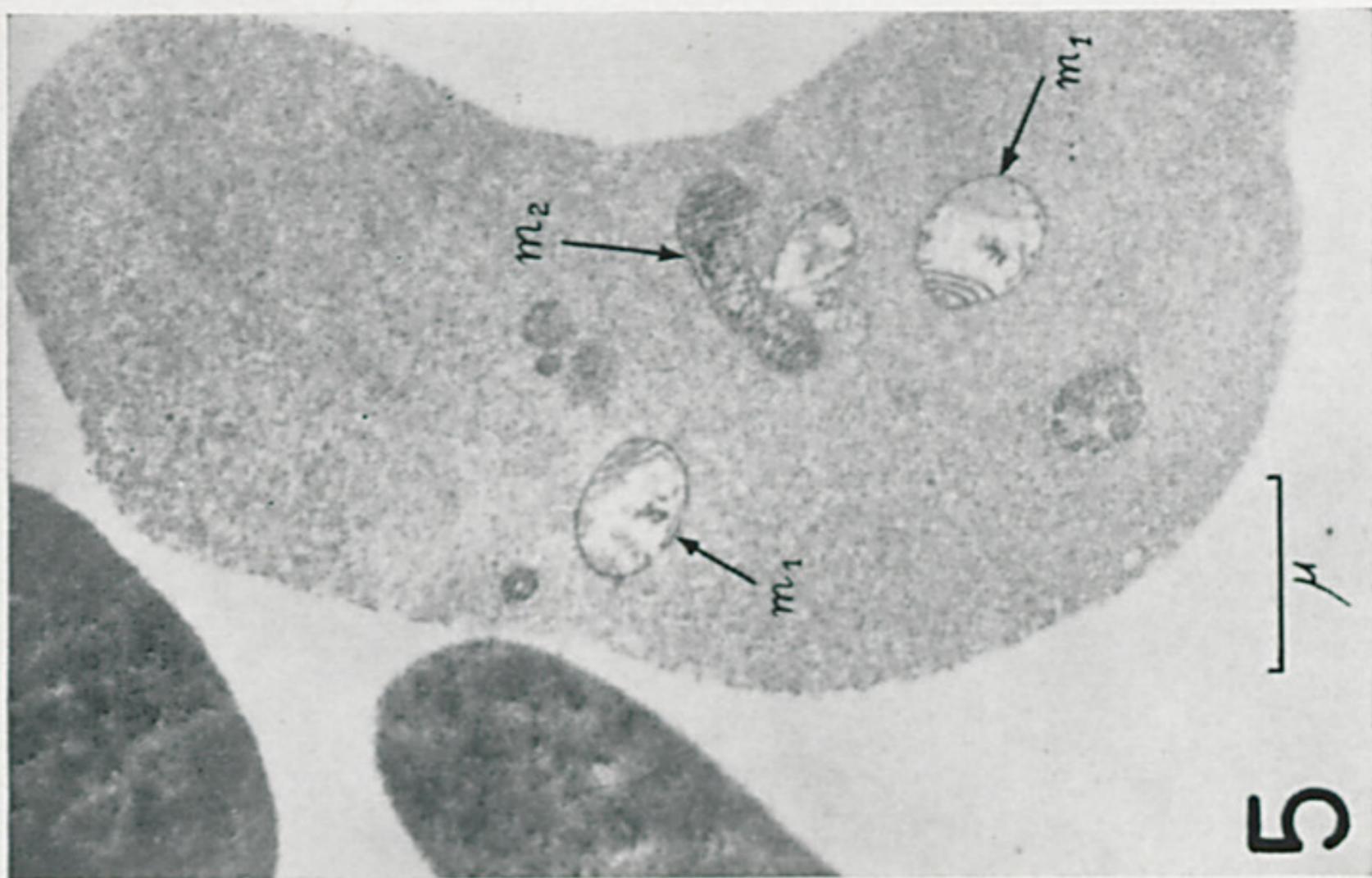


FIG. 6 — Anemia por sangria. Corte de reticulocito, fixado 10 segundos após o início do processo de hemólise em água destilada. Observa-se uma mitocôndria, provavelmente filamentosa, num estágio de alteração conseqüente a modificações osmóticas violentas, com diâmetros aumentados e estrangulamentos mais ou menos periódicos. As lamelas (1) se apresentam rompidas ou desintegradas. Ao longo do limite do organelo distendido observam-se ainda resíduos das membranas duplas interna e externa (md). O aspecto das mitocôndrias, de reticulocitos de casos de saturnismo (fig. 2a), é semelhante ao desta mitocôndria. Estroma (e) mais denso aos electrons.

FIG. 6 — Bleeding anemia. Section of reticulocyte fixed 10 seconds after beginning hemolysis in distilled water. A mitochondrion, probably filamentous, appears in a modified stage provoked by violent osmotic changes; it presents increased diameters and periodical strangulations. Lamellae (1) are disrupted or disintegrated. Along the border of the distended organelle there are still traces of the internal and external membranes (md). In saturnism (fig. 2a), mitochondria present similar aspects. The reticulocyte is limited by a more electron dense band corresponding to the stroma (e).

FIG. 7 — Anemia por sangria. Reticulocito hemolisado em suspensão em água destilada. No interior do estroma observam-se formas circulares (m) às vèzes não completamente individualizadas, correspondendo às mitocôndrias primitivamente filamentosas.

FIG. 7 — Bleeding anemia. Reticulocyte hemolysed in suspension in distilled water. Inside the stroma appear round elements (m), sometimes not perfectly individualized, which correspond to primitively filamentous mitochondria.

FIG. 8 — Anemia por sangria. Corte de reticulocito preparado em idênticas condições ao da fig. 6. As lamelas duplas (1) foram surpreendidas distanciadas da membrana externa (me), no centro da mitocôndria alterada durante a hemólise parcial. A seta (e) aponta o estroma rompido na altura da mitocôndria, possivelmente, durante as manipulações para a inclusão.

FIG. 8 — Bleeding anemia. Thin section of reticulocyte prepared under identical conditions as that of fig. 6. The double lamellae (1) were detected in the center of the mitochondrion, having been separated from the external membrane (me) during partial hemolysis. Arrow (e) points to the stroma disrupted at the level of the mitochondrion, possibly during handling for inclusion.

FIG. 9 — Anemia por sangria. Corte de reticulocito fixado com formol em salina hipotônica e corado pelo ácido fosfotúngstico. As mitocôndrias se apresentam com diâmetros aumentados e limitadas pela membrana externa (me), contendo no centro o conjunto de lamelas duplas (1). A membrana do estroma se apresenta rompida na altura de uma mitocôndria. Estas mitocôndrias e a da figura anterior, sugerem que o componente estrutural que confere a êstes organelos a propriedade de responder às alterações osmóticas do meio, é a membrana limitante externa.

FIG. 9 — Bleeding anemia. Section of reticulocyte fixed with formalin in hypotonic saline solution and stained by phosphotungstic acid. Mitochondria present increased diameters and are limited by the external membrane (me); double lamellae (1) are centrally disposed. The membrane of the stroma appears disrupted at the level of a mitochondrion. From this and the preceding micrographs it may be concluded that the structural component responsible for the organelle's property of swelling in hypotonic media is the external membrane.

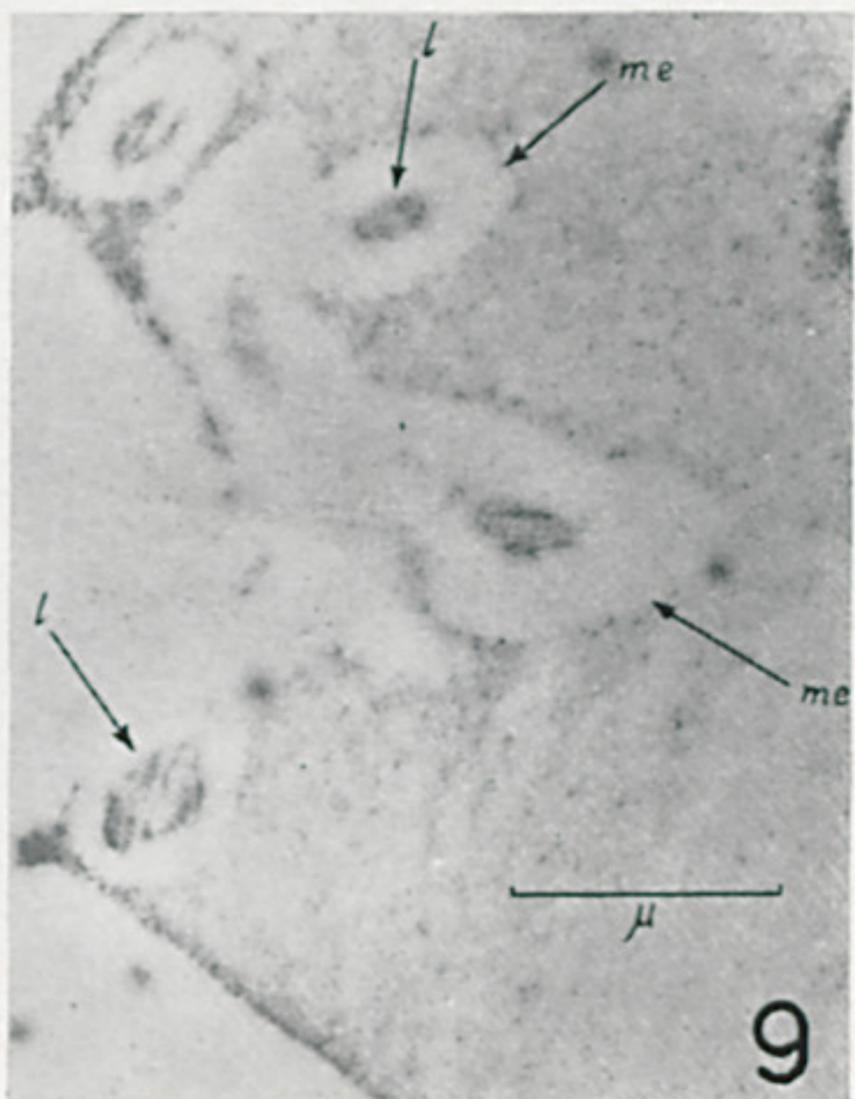
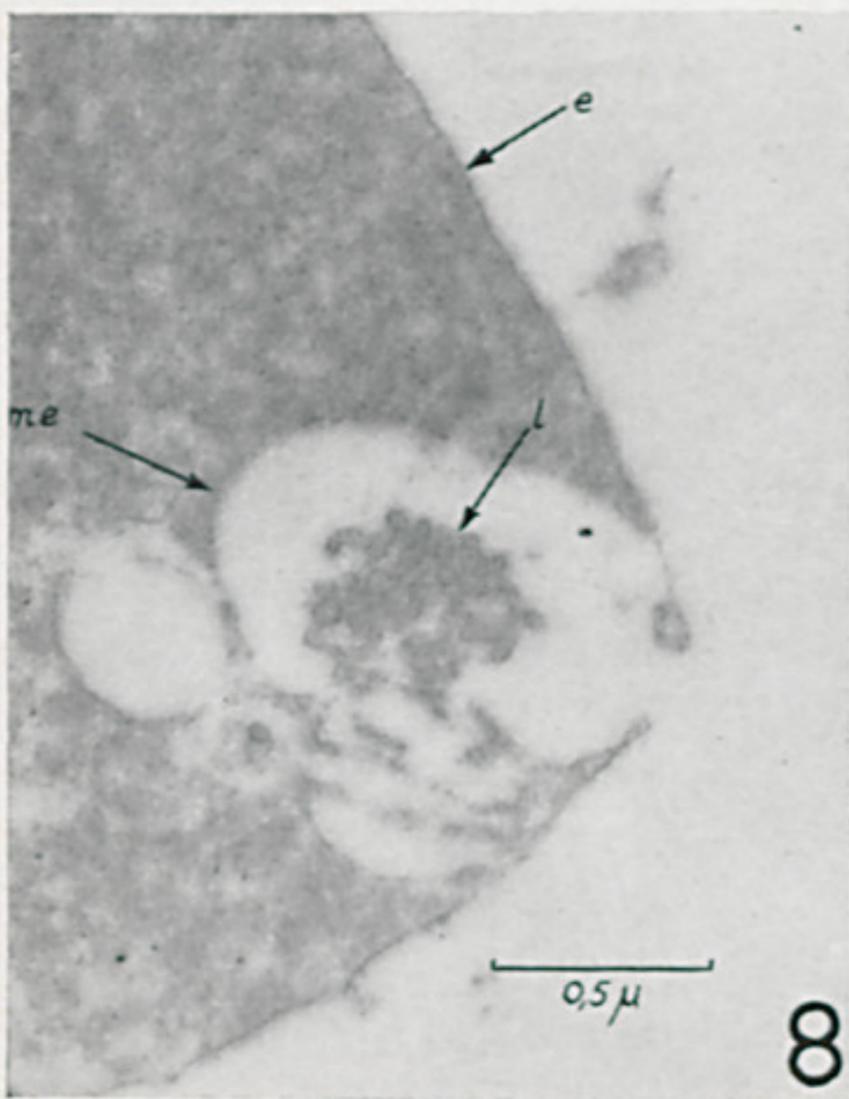


FIG. 10 - Saturnismo. Normoblasto circulante com núcleo (N) e retículo endoplasmático (re). As mitocôndrias (m) se apresentam igualmente aumentadas de volume.

Fig. 10 — Saturnism. Circulating normoblast with nucleus (N) and endoplasmic reticulum (re). Mitochondria (m) show also increased volumes.

