



ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS NO TIMO, BAÇO E PLACAS DE PEYER DURANTE A EXPOSIÇÃO PRÉ E PÓS-NATAL AO ÁLCOOL

Morphometric alterations in the thymus, spleen and peyer's patches during pre and post-natal alcohol exposition

Renata Kelly de Araújo Veiga¹; Mario Ribeiro de Melo-Júnior^{1,2}; Jorge Luiz Silva Araújo-Filho¹; Luciano de Albuquerque Mello¹; Nicodemos Teles de Pontes-Filho^{1,3}

1. Setor de Patologia - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil (local de realização do trabalho);
2. Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES;
3. Departamento de Patologia - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Autor para correspondência e-mail: mariormj@gmail.com

Recebido em 01/02/2007 - Aceito em 22/06/2007

RESUMO: O alcoolismo materno em seres humanos e animais de laboratório tem sido implicado no desenvolvimento de distúrbios imunológicos em recém-nascidos. O presente estudo foi realizado a fim de analisar, através de métodos histomorfométricos, os efeitos da ingestão crônica de etanol em ratos pré e pós-natal em tecidos provenientes do timo, fígado e placas de Peyer de recém-nascidos. O modelo experimental utilizou ratos Wistar machos, cujas mães receberam o etanol (3g/Kg do peso de corpo) da gestação ao desmame (40 dias). O grupo controle (GC) e grupo etanol (GE) receberam dieta comercial normal. As preparações histológicas dos tecidos foram coradas com Hematoxilina-eosina e Tricômico de Masson para o estudo morfológico e histoquímico. A análise morfométrica foi realizada através do software OPITMASTM 6.1. Os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas nas contagens de leucócitos periféricos e nos pesos corporais entre os grupos estudados. Os filhotes do GE exibiram um aumento significativo no número total, bem como na área e volume do folículo linfóide no baço. No timo, não houve uma redução significativa dos corpúsculos de Hassall entre o GE e GC. No grupo etanol foi observado uma infiltração de colágeno intersticial e adipócitos nos lóbulos do timo. As placas de Peyer apresentaram uma redução significativa no número total de placas e de folículos linfóides. Entretanto, nenhuma alteração foi observada na área ou no volume de ambas as estruturas quando comparadas ao grupo de controle. Os resultados sugerem que o alcoolismo materno durante os períodos pré e pós-natal contribui com alterações histológicas importantes nos órgãos linfóides dos animais descendentes.

Palavras-chaves: Baço, Placas de Peyer's, Etanol.

ABSTRACT: Maternal alcoholism, both in human beings and in laboratory animals, has been involved in the development of immune functional disturbances in neonates. The present work was accomplished in order to evaluate, through histomorphometric methods, the effects of the pre and post-natal ethanol chronic ingestion on the histologic profiles of the thymus, spleen and Peyer's patches of the offsprings. The experimental model was set up with male rats, whose mothers received ethanol (3g/Kg of body weight) from the gestation to the weaning (40 days). Both the control and ethanol group received commercial normal diet. Hematoxylin-eosin and Masson Thricomic-stained histologic preparations of the tissues were used for microscopic study. The morphometric analysis was accomplished through the software OPITMASTM 6.1. The obtained results showed not significant differences in the blood leucocyte counts and body weights when the groups were compared. The littermates from ethanol treated females presented: a significant rise in the total number, as well as in the mean area and volume of the lymphoid follicles of the spleen. In the thymus, there was not significant reduction of the Hassall's corpuscles between ethanol and control group. In the ethanol group was observed interstitial collagen and adipocyte infiltration in the thymic lobules. The Peyer's patches presented significant reduction in the total number of patches and

lymphoid follicles. However, there no alteration was observed in the area or in the volume of both structures when compared to the control group. The results suggest that the maternal alcoholism during the pre and post-natal periods contributes to important histological alterations in the lymphoid organs of the male descendants.

Keywords: Spleen, Peyer's patches, ethanol.

INTRODUÇÃO

O alcoolismo é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. O consumo de álcool tem impacto nos diferentes sistemas orgânicos, por exemplo, no sistema nervoso central, no trato gastrointestinal, nos órgãos hematopoiéticos e no sistema imune (FENG et al., 2003; REESES & POLISH, 2003).

Por ser uma molécula pequena, solúvel em água e lipídios, o etanol permeia todos os tecidos e pode, quando em uso crônico e abusivo, causar uma ampla variedade de alterações sistêmicas (GUERRINI et al., 2007).

A exposição pré-natal ao etanol causa anormalidades físicas e mentais nos recém-nascidos. Experimentos desenvolvidos em roedores (ZHU & SEELIG, 2000), e pesquisas em seres humanos comprovam os efeitos embriotóxicos do etanol sobre os tecidos (SCHLEIFER et al., 2002).

Dentre as seqüelas importantes que amplificam os efeitos teratogênicos do álcool inclui-se a desnutrição materna, a disfunção placentária e os distúrbios na formação dos órgãos (SHIBLEY et al., 1999). Após a descrição da síndrome do alcoolismo fetal, desenvolveram-se diferentes modelos animais para compreender melhor como o consumo materno de álcool durante a gravidez poderia afetar os recém-nascidos, nos demais órgãos além do cérebro (MELO-JÚNIOR et al., 2001; BRITO et al., 2005).

Embora as deficiências da resposta imune primária tenham sido descritas (COCARLA et al., 2002; SHER, 2003), ainda não está esclarecida se as alterações patológicas nos órgãos linfóides no alcoolismo fetal representam uma causa ou uma conseqüência da injúria sofrida pelo organismo.

Baseando-se nesses dados, este estudo teve a finalidade de investigar os efeitos da exposição crônica materna ao etanol durante a gestação e a lactação sobre a imuno-arquitetura do timo, baço e placas de Peyer dos descendentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos Éticos - O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (CCB-UFPE), ofício n° 120/2003.

Animais e Dietas - Para o acasalamento foram colocadas em cada gaiola três ratas fêmeas e um macho da linhagem Wistar. A gestação era confirmada pela identificação de células descamativas, muco gestacional e espermatozoides ao exame microscópico (Microscópio Zeiss 25, 10x). Posteriormente as matrizes foram separadas de acordo com o protocolo experimental, no máximo duas por gaiola, e ali mantidas até o 18º dia de gestação. A partir deste período foram transferidas para gaiolas individuais até o final do aleitamento (25º dia de vida dos filhotes).

No período compreendido entre o primeiro dia de gravidez e o último do aleitamento, as matrizes foram mantidas com dieta comercial LABINA® contendo 23% de proteínas, com dois tratamentos por gavagem (administração diária de água filtrada ou de etanol). A gavagem foi executada sempre entre às 7:00 e 9:00 horas da manhã. Os filhotes das matrizes assim tratadas originaram os dois grupos experimentais desse trabalho, descritos a seguir:

GRUPO CONTROLE (GC; n=12) – oriundos de mães mantidas com a ração LABINA® e recebendo doses de 3,8 ml de água filtrada. Assim, as matrizes desse grupo foram submetidas ao mesmo estresse, causado pela contenção e gavagem, sofrido pelas gestantes do grupo etanol;

GRUPO ETANOL (GE; n=10) – procriados por matrizes mantidas com LABINA® e recebendo etanol na dose de 3g/kg de peso corporal, diluído em água filtrada, em volume total de 3,8 ml (Álcool Etilico Absoluto P.A. – VETEC®, Lote: 013471);

No terceiro dia após o parto executou-se a sexagem excluindo-se as fêmeas devido à conhecida influência dos hormônios sexuais femininos no metabolismo do álcool (BERMAN et al., 1996). Os filhotes machos de cada grupo experimental, gerados por diferentes matrizes, foram misturados entre si e mantidos em ninhadas de 4 a 6 animais. A padronização do tamanho da ninhada teve como objetivo eliminar a desnutrição induzida por grandes ninhadas durante a lactação (DE LUCA et al., 1997).

Após o desmame, a administração de substâncias por gavagem foi interrompida e os filhotes foram mantidos com a dieta LABINA® correspondente até o dia da perfusão (40 dias).

Peso corporal - Os animais foram pesados a partir do 3^o dia após o nascimento até o 40^o dia de vida. A opção pela pesagem a partir do 3^o dia após o nascimento foi decorrente da observação de aumento da agressividade e canibalismo entre as matrizes submetidas ao tratamento com etanol, quando os filhotes eram manipulados nos dois primeiros dias de vida.

Perfusão - Aos 40 dias de vida os filhotes foram pesados e anestesiados, por via intraperitoneal, com solução contendo uretana a 10% (1g/Kg) e cloralose a 0,4% (40 mg/Kg) de acordo com o peso corporal. Antes da perfusão, foi feita a coleta de sangue e confeccionados estiraços em lâminas histológicas, para proceder a contagem diferencial dos leucócitos. Para execução da perfusão procedeu-se ampla abertura do tórax para exposição do coração. Após a injeção de 0,1 ml de heparina (Liquemine[®]) no ventrículo esquerdo, para evitar a coagulação sangüínea, introduziu-se na mesma região uma cânula de polietileno (por onde foram injetadas as soluções de perfusão) e concomitantemente fez-se a abertura do átrio direito.

Desta forma, tanto o sangue quanto às soluções de perfusão eram eliminadas por aquela abertura. Após o bloqueio da aorta abdominal com uma pinça hemostática procedeu-se a perfusão com o auxílio de um compressor com pressão regulada em torno de 90 mmHg. Para a remoção do sangue e manutenção da integridade tecidual injetou-se através da cânula um volume em torno de 100 a 150ml de uma solução de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M, pH 7.2, contendo 0,9% por volume de NaCl. A seguir, perfundiu-se um volume em torno de 150 a 300 ml de formaldeído a 10%, diluído em PBS, controlando-se a fixação do tecido pelo volume inoculado e a rigidez da cabeça e dos membros. Finalizada a perfusão procedeu-se à retirada do timo, baço e intestino em seguida mergulharam-se os mesmos em formalina a 10% tamponada.

Microtomia e Histoquímica - Após a fixação (tempo mínimo de 48h), foram cortados três regiões equidistantes do baço e timo, medindo aproximadamente 0,2 cm. Para o intestino delgado, foram selecionadas porções da borda anti-mesentérica que continham nodulações (Placas de Peyer) visualizadas através de lupa estereoscópica (OLYMPUS).

Todos os fragmentos foram submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina. Os cortes histológicos (4µm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan) e corados com Hematoxilina-Eosina e Tricômico de Masson.

Análise Morfométrica e estatística - A análise morfométrica foi realizada através de um sistema computacional de análise de imagens (softwares TCI-Pro[®] e OPTIMAS[™] 6.1). Foram obtidos o número (magnificação 400x), área e volume médio (magnificação 200x) dos folículos linfóides do baço e das placas de Peyer, através da análise de quatro campos aleatórios por lâmina.

Foi obtido o número médio de corpúsculos de Hassal na região medular dos lóbulos tímicos, analisando-se 10 campos por lâmina (área do campo = 12.234 µm²).

As medidas obtidas foram submetidas ao estudo estatístico utilizando-se os Testes t de Student e de Tukey, com p < 0,05, através do software PRISMA 3.0[®].

RESULTADOS

O peso dos filhotes não diferiu estatisticamente entre o grupo etanol (63,6g) e grupo controle (52,3g), desde o nascimento até a idade experimental.

A contagem diferencial dos leucócitos no sangue periférico dos grupos estudados, não apresentou variações estatisticamente significativas, principalmente nas populações de linfócitos (Tabela 1). Todos os animais apresentaram contagem leucocitária dentro dos padrões normais para a espécie segundo dados de HARKNESS & WAGNER (1993).

Tabela 1. Contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico de ratos Wistar (40 dias) expostos ao álcool durante o período pré e pós-natal.

CÉLULA *	GRUPO	
	Álcool (n = 12)	Controle (n = 10)
Basófilos	0,2	0,2
Segmentados	26,2	26,1
Linfócitos	66,8	67,3
Eosinófilos	1,8	1,6
Monócitos	5,0	4,8

* Valores médios (%).

Não foram observadas alterações macroscópicas quanto à morfologia externa, a cor e textura do baço, timo e intestino delgado nos grupos estudados.

As principais alterações microscópicas concentram-se na polpa branca onde se observou aumento estatisticamente significativo do número total de folículos assim como, do número de folículos secundários no grupo álcool. (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio total de folículos e folículos secundários por segmento do baço de ratos Wistar expostos ao álcool durante o período pré e pós-natal.

CONTAGEM	GRUPO		p
	CONTROLE	ÁLCOOL	
NTF	44,55 ± 5,85	53,77 ± 8,39 *	*(p < 0,05)
NFS	6,44 ± 4,06	23,66 ± 3,04 **	** (p < 0,01)

NTF (Número Total de Folículos); NFS (Número de Folículos Secundários).

Os centros germinativos dos folículos linfóides, principalmente no grupo etanol, são esféricos, apresentando zona clara e escura, devido aos diferentes tamanhos e estados de amadurecimento dos linfócitos e células do tipo reticulares predominantes (Figura 1).

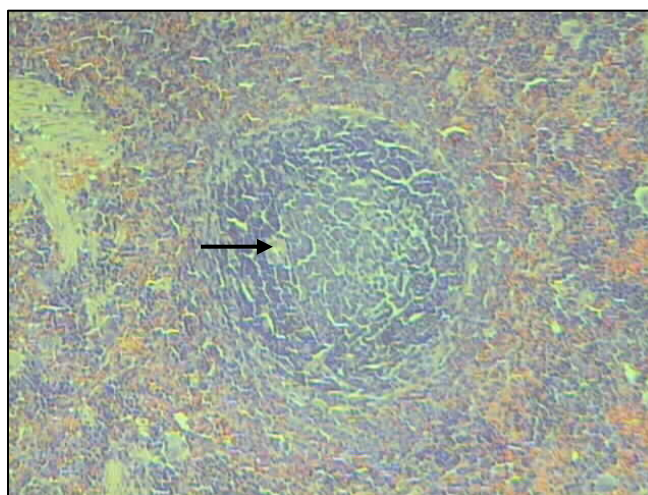


Figura 1. Folículo linfóide secundário no baço de rato jovem. Pode se observar centro germinativo na região interna do folículo (seta). Grupo etanol, HE. Magnificação 100x.

Da mesma forma, tanto a área como o volume dos folículos linfóides totais apresentou diferença estatística significativamente maior (46,67%) no grupo etanol quando comparado ao controle (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios da área e volume dos folículos linfóides esplênicos de ratos Wistar expostos ao álcool durante o período pré e pós-natal.

GRUPO	ÁREA (μm^2)	VOLUME (μm^3)
Controle	26407,55 ± 10603,8	3842647,05 ± 1575478
Álcool	35919,22 ± 3178,0*	5636302,20 ± 1304591**

* (p < 0,05) ** (p < 0,01).

No timo, a avaliação quantitativa do número médio de corpúsculos de Hassal (Figura 2A) demonstrou que o grupo etanol apresentou um número significativamente menor quando comparado ao grupo controle (Figura 3).

Da mesma forma constatou-se que havia um padrão mais intenso de infiltrações de adipócitos entre os lóbulos tímicos e uma maior deposição de colágeno intersticial (Figura 2B) no grupo etanol quando comparado ao controle.

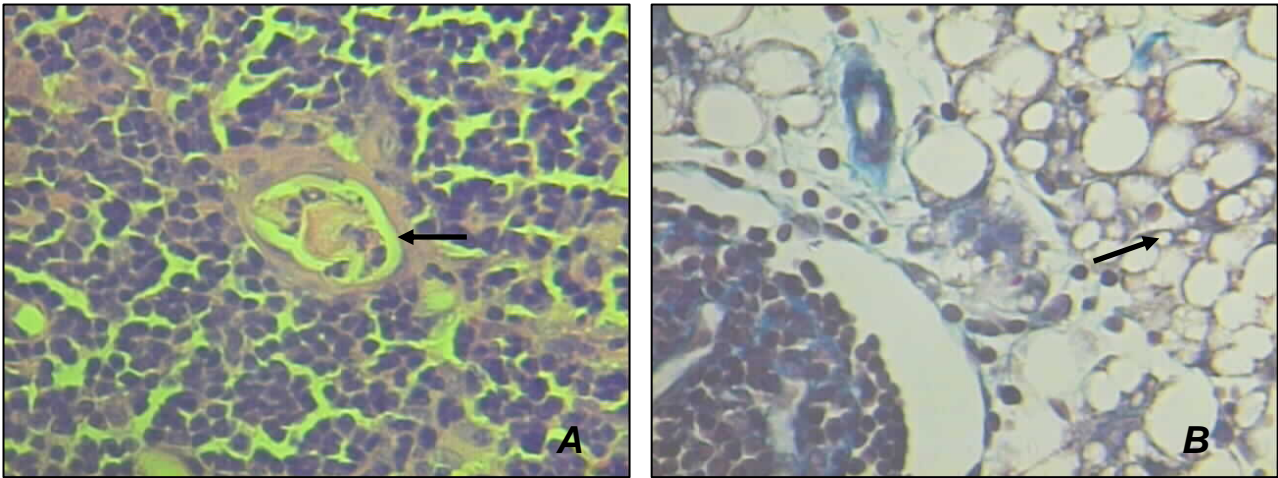


Figura 2. Caracteres histológicos do timo resultantes da exposição crônica ao etanol em ratos jovens. (A) Corpúsculo de Hassal (seta); (B) Infiltrado de células adiposas no parênquima tímico (seta). Magnificação: A (400x) e B (100x). Coloração em A, Hematoxilina-Eosina) e em B, Tricrômico de Masson.

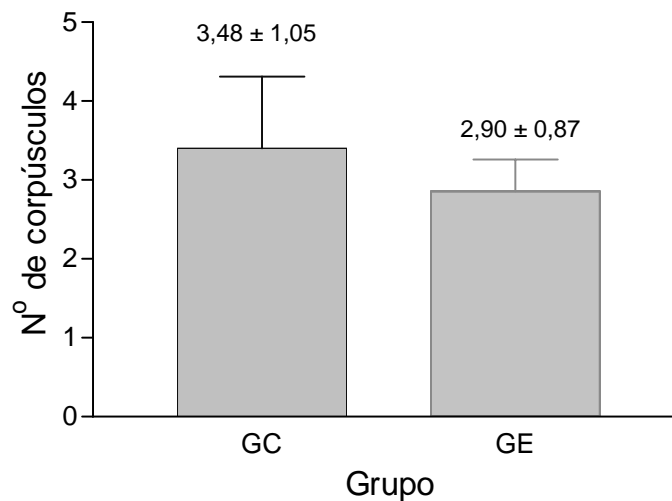


Figura 3. Número médio de corpúsculos de Hassal no timo de ratos jovens expostos ao álcool durante o período pré e pós-natal.

O estudo histológico das placas de Peyer não evidenciou diferença morfológica qualitativa entre o grupo etanol e o grupo controle. Em relação ao número de folículos por placa observou-se que era variável nos dois grupos, sendo mais freqüente a presença de dois a três em cada uma delas (Figura 4).



Figura 4. Aspecto geral de uma placa de Peyer no intestino delgado de rato jovem. Observa-se a presença de quatro folículos linfóides. Grupo etanol, HE. Magnificação, 100x.

O estudo dos dados morfométricos obtidos demonstrou que houve diferença significativa em relação ao número de placas e de folículos linfóides entre os grupos (Tabela 4). O grupo controle apresentou um número mais significativamente elevado de placas ($15,2 \pm 1,48$) quando comparado ao grupo exposto ao etanol ($9,8 \pm 1,30$; $p < 0,01$); bem como, uma quantidade maior de folículos ($41,2 \pm 5,76$) em relação ao grupo álcool ($30,0 \pm 8,83$; $p < 0,05$).

Tabela 4. Número médio total de folículos e de placas de Peyer de ratos Wistar expostos ao álcool durante o período pré e pós-natal.

Padrão	Grupo		p
	Controle	Álcool	
NTP	$41,2 \pm 5,6$	$30,0 \pm 8,8$ **	**($p < 0,05$)
NTF	$15,2 \pm 1,4$	$9,8 \pm 1,3$ *	*($p < 0,01$)

NTP (Número Total de Placas); NTF (Número Total de Folículos)

Os demais parâmetros avaliados (área e volume das placas; área e volume dos folículos) não diferiram estatisticamente (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios da área e volume das placas de Peyer e folículos linfóides totais no intestino delgado de ratos Wistar (40 dias) expostos ao álcool durante o período pré e pós-natal.

Grupo	Área (μm^2)		Volume (μm^3)	
	Placas	Folículos	Placas	Folículos
Controle	$448,8 \pm 51,8$	$112,8 \pm 29,7$	$4290,8 \pm 109,8$	$1240,8 \pm 119,0$
Álcool	$417,3 \pm 45,7$	$157,3 \pm 49,8$	$4460,8 \pm 332,0$	$1480,4 \pm 246,2$

DISCUSSÃO

O alcoolismo como tema de estudos é sempre atual, devido suas conseqüências sócio-econômicas, além da repercussão no próprio indivíduo, com ação tóxica sobre órgãos e tecidos desencadeando diferentes mecanismos lesionais. Estudar seus efeitos não é uma tarefa simples, principalmente quando se avalia suas implicações nos compartimentos imunológicos. Os resultados são freqüentemente contraditórios devido a forte influência de co-fatores principalmente em pesquisas clínicas, como comportamento individual, cultura, tradição e condição sócio-econômica. Desta forma torna-se importante o estudo dos efeitos do álcool em condições controladas para se reconhecer à amplitude dos diferentes efeitos desta substância sobre o organismo (GUERRINI et al., 2007).

O estudo dos órgãos linfóides é um aspecto de fundamental importância na demonstração das alterações dos compartimentos imunológicos quando expostos a agentes estranhos ao organismo (ROTH et al., 2006). Daí o nosso interesse em avaliar o comportamento das células e tecidos envolvidos na resposta imune quando submetidas a uma injúria por um agente teratogênico, como o álcool.

Os resultados, quanto às curvas de pesos dos animais de ambos os grupos estudados, não mostraram variações significativas, diferentemente dos observados em outro estudo, em que se constatou um decréscimo do peso corporal, atribuído principalmente pela diminuição na produção e ingestão de leite pelos filhotes (TAVARES et al., 1999; JOSHI et al., 2003).

No presente trabalho, as contagens diferenciais de leucócitos no sangue periférico mantiveram-se inalteradas, um resultado de certa forma contraditório face à acentuada hiperplasia linfóide observada no baço.

Na verdade, investigações desses valores no alcoolismo crônico têm mostrado resultados conflitantes. LIVANT et al. (1997) relatam o aumento de leucócitos periféricos, principalmente linfócitos. Por outro lado também foi demonstrado o aumento de linfócitos no sangue periférico de ratos, quando havia interação entre a exposição pré-natal ao etanol e o estresse pelo frio (GIBERSON, 1997). Em mulheres etilistas e fumantes, foram demonstradas variações no número de leucócitos circulantes, resultando em leucopenia, atribuíveis à distúrbios funcionais do baço (ZHU & SEELIG, 2000).

No timo, a análise quantitativa do número médio de corpúsculos de Hassal não mostrou existir diferenças entre os dois grupos estudados. Entretanto, o grupo etanol apresentou um aumento de infiltrado de células adiposas entre os folículos tímicos bem como deposição de colágeno intersticial. Estudos anteriores afirmam que após o nascimento, o timo começa a involuir, resultado de seu processo de atrofia, e é infiltrado por células adiposas (HALASZ et al., 1993; WANG & SPITZER, 1997).

Outros trabalhos também sugerem que a excessiva exposição ao etanol *in vivo* induz a atrofia tímica em ratos desde a vida uterina (WANG & SPITZER, 1997). Em razão destes relatos e da nossa observação de que há maior deposição de fibras colágenas e infiltração adiposa no parênquima tímico do grupo etanol acreditamos que esta substância realmente acelera o processo de atrofia tímica. Tal observação é crítica pelo fato de permitir supor que o alcoolismo materno interfere em uma importante etapa do desenvolvimento do sistema imune dos filhotes, ou seja, a maturação da imunidade celular.

A formação dos órgãos linfóides inicia-se durante o período embrionário e fetal e sua maturação é concluída após o nascimento. Desta forma, no animal recém-nascido a população linfocitária presente no baço, linfonodos e tecido linfóide associado às mucosas pode ser reduzida se fatores bloqueadores interferirem na proliferação linfocitária nos órgãos linfóides primários (SILVA et al., 2006).

Em um modelo experimental desenvolvido com camundongos observou-se que no início da gestação os linfócitos migram do timo e da medula óssea para o intestino originando ali as placas de Peyer (BRITO et al., 2005). Sendo esse tecido linfóide estruturado durante a vida fetal não ocorre formação de novas placas após o nascimento (LIMA et al., 2002; CRABB et al., 2004).

Por outro lado, observou-se que nesses animais a exposição crônica ao álcool induz atrofia do timo, responsável por 80% dos linfócitos presentes nas placas (WATZL & WATSON, 1992). Assim, mesmo considerando as diferenças entre os animais utilizados, podemos deduzir que a redução do número total de placas e folículos linfóides intestinais detectados no nosso experimento foi causada pelo mesmo fator, isto é, a atrofia tímica. Paradoxalmente observamos que a área e o volume das placas e dos folículos nelas presentes não sofreram alterações.

Estes dados sugerem que embora haja interferência do etanol na migração dos linfócitos tímicos, aqueles que migraram foram suficientes para proliferar e formar placas e folículos linfóides, embora em menor número, com dimensões semelhantes ao grupo controle. Embora seja patente que a exposição ao etanol resulta em alterações no comportamento desse tipo celular esses achados são de difícil interpretação.

A depleção (hipoplasia) folicular, em outros órgãos linfóides e diretamente associada ao consumo de etanol, já foi relatada em seres humanos e animais de laboratório (HALASZ et al., 1993; GILBERSON, 1997; LASO et al., 1996). Sabe-se que o consumo de álcool induz diretamente a uma supressão de macrófagos e células M, responsáveis pela captação e apresentação de antígenos aos linfócitos e também, uma redução

significativa no número de células produtoras de IgA, principal componente da resposta imune pelas placas de Peyer (DIAMOND & GORDON, 1997; LOPES et al., 1994).

Assim, a hipoplasia linfocitária estaria relacionada a esse efeito e a outros fatores imunodepressores álcool induzidos já relatados por ESTRADA et al. (1996). Estes autores encontraram alterações intestinais, como diminuição da absorção e da flora microbiana reduzindo assim a exposição dos animais descendentes a antígenos que utilizam a mucosa intestinal como porta de entrada (BUTS et al., 1992; MELO-JUNIOR et al., 2006). Essas condições justificariam, portanto os resultados obtidos por LOPEZ et al. (1997) que demonstrou haver uma redução no número total de células linfocitárias nas placas de Peyer de ratos jovens e adultos expostos ao etanol. No nosso entendimento devemos considerar que a divergência dos nossos resultados deve-se a metodologia empregada no presente experimento.

Diferentemente dos outros autores não executamos o estudo morfométrico durante o período de exposição ao álcool, pois nossas medidas foram tomadas (40 dias de vida) após uma abstinência de 15 dias a partir do desmame (25º dia). Nesse contexto, poder-se-ia especular que, com a abstinência ocorreu maior ingestão de alimentos, restauração da capacidade absorptiva intestinal, um fluxo progressivamente maior de antígenos e eliminação do bloqueio metabólico de macrófagos, células M e linfócitos. A cessação dos efeitos tóxicos do álcool possibilitou a recuperação dos mecanismos de ativação imune, ocorrendo intensa proliferação linfocitária o que restabeleceu a área e o volume das placas e folículos existentes, recuperando-se assim, as dimensões equivalentes as dos animais controle. Esta hipótese é respaldada pelas observações de ESTRADA et al (1996) que relataram a reversão das alterações estruturais e funcionais do intestino, produzida pelo álcool, após 15 dias de abstinência.

A mensuração dos tecidos linfóides tem sido realizada pela morfometria manual ou utilizando-se sistemas semi-quantitativos (HALASZ et al., 1993). O método morfométrico digital utilizado neste trabalho tem a vantagem de poder correlacionar diversos parâmetros entre si, como também fornecer estimativas tridimensionais (volume), constituindo-se em uma importante ferramenta para melhor classificação dos compartimentos linfóides (MELO-JUNIOR et al., 2001; LIMA et al., 2002).

De fato, o estudo morfométrico da imunoarquitetura dos órgãos linfóides é essencial para a demonstração dos mecanismos de defesa e para evidenciar as alterações dos mesmos quando o organismo humano ou animal é exposto a agentes estranhos (BRITO et al 2005).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, no baço, ocorreu modificação nos folículos linfóides, com aumento do número total, área e volume dos folículos, caracterizando intensa hiperplasia folicular com aumento expressivo (267%) no número de folículos secundários.

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes quanto à presença de alterações na atividade folicular esplênica, quando comparados com as observações de outros autores que utilizaram diferentes técnicas de medição (MELO-JUNIOR et al., 2006).

A hiperplasia dos folículos do baço no grupo etanol, caracterizada principalmente no desenvolvimento de centros germinativos, provavelmente se deve à presença de linfócitos B, que possuem receptores de superfície na forma de uma imunoglobulina capaz de realizar ligação direta a antígenos de qualquer tamanho, em solução ou forma sólida (CULVERHOUSE et al., 2005).

Acredita-se que durante a resposta imunitária, as células linfocitárias B de memória ocupam a região do centro germinativo esplênico (GODLETT et al., 2005), evidenciando que uma das conseqüências do grande número de folículos secundários no grupo exposto ao etanol no presente estudo pode ser resultado da ativação deste tipo celular, tanto para mobilizar defesas, como para montar uma "memória imunológica" para essa substância. Embora seja conceitual que a exposição ao etanol, por mecanismos diretos e indiretos ainda não esclarecidos, tenha resultado na ativação desse tipo celular, esses achados são de difícil interpretação.

Em relação a exposição ao etanol nos períodos pré e pós-natal, nossos resultados confirmam as conclusões de SZABO (1999), onde o etanol causa alterações no desenvolvimento imune fetal, sendo neste caso a lactação também o período crítico de maior sensibilidade do sistema imunológico.

O etanol mostrou ser uma substância que interfere no timo e na formação dos centros germinativos e maturação das placas de Peyer durante o período pré-natal. Demonstrando-se que a habilidade das células imunes em responder a estimulação antigênica pode ser afetada também por fatores intrínsecos (idade, genética, outros estados patológicos associados) e extrínsecos (desnutrição, estresse ambiental), o que explica a diversidade de resultados, em geral obtidos através de metodologias diferentes (MELO-JUNIOR et al., 2001; LIMA et al., 2002).

Embora se possa cogitar que tal efeito tenha tido início durante a vida fetal, uma conclusão definitiva a este respeito só poderia ser formulada se os animais tivessem sido examinados imediatamente após o nascimento. Não obstante, CHVATSKO et al (1996) afirmaram que o desenvolvimento de centros germinativos é quase inteiramente resultante da estimulação antigênica pós-natal.

Vale ressaltar que neste modelo experimental, antígenos outros além do etanol, podem ser transferidos da mãe aos descendentes; por exemplo, antígenos alimentares e/ou contaminação por bactérias do próprio ambiente em que os recém-nascidos viveram. Em recém-nascidos humanos, a prevalência de centros germinativos no

baço, com aumento rápido após o nascimento, evidenciando dois fatos importantes, a ausência de deficiência na resposta imune celular fetal e evidências de estimulações antigênicas precoces.

Na pesquisa do alcoolismo em modelos animais, muitas questões podem ser simplificadas em relação ao estudo em humanos e tal possibilidade facilita a sensibilidade e precisão dos resultados a fim de se estabelecer melhores medidas de tratamento do consumo exagerado do álcool (HANNIGAN, 1996; GUERRINI et al., 2007).

Nesse contexto, o modelo experimental utilizado no presente trabalho, nos parece fornecer informações importantes sobre os efeitos da exposição ao etanol nos períodos pré e pós-natal sobre a imunoarquitetura intestinal, isto é, ocorre: 1) redução significativa (35,53%) no número médio de placas de Peyer em ratos jovens; 2) diminuição no número total de folículos linfóides das placas de Peyer no intestino delgado (27,2%); 3) não há variação estatisticamente significativas na área e no volume das placas e folículos linfóides entre os grupos estudados.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos pela metodologia empregada nos permite concluir que não há variação estatisticamente significativa da contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico, peso médio corporal entre os grupos estudados.

No timo não há diferença significativa do número de corpúsculos de Hassal entre o grupo etanol e o grupo controle. Entretanto, existe maior deposição de colágeno intersticial e infiltrado de adipócitos entre os lóbulos tímicos no grupo etanol.

Nos animais do grupo etanol houve um aumento estatisticamente significativo nos seguintes parâmetros do baço: número total de folículos; área e volume médios dos folículos e número de folículos secundários.

Nas placas de Peyer, O etanol determinou uma redução significativa no número médio e no número total de folículos linfóides das placas de Peyer no intestino delgado. Por outro lado, não houve variações estatisticamente significativas na área e volume das placas e folículos linfóides entre os grupos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERMAN, R. F.. Prenatal alcohol exposure and effects of environmental enrichment on hippocampal dendritic spine density. *Alcohol*. v. 13, p. 209-216, Aug, 1996.

BRITO, A. S. C. et al. Exposição de ratas adultas a doses crônicas de aguardente: estudo ponderal e histomorfológico do coração. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernam*. v. 50 n.2, p. 100-103, Feb, 2005.

BUTS, J. P.; SOKAL, E. M.; VAN-HOOF, F. Prenatal exposure to ethanol in rats: effects on postnatal maturation of the small intestine and liver. *Pediatric Res*. v.32 p. 574-579, Sept, 1992.

CHVATCHKO, Y. et al. Germinal centre formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge. *J. Exp. Med*. v. 184, p. 2353-2360, Jan, 1996.

CRABB, D.W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc. Nut. Soc*. v. 63, p. 49-63, Sept, 2004.

COCARLA, D.; DURAN, A.; URAM-TUCULESCU, C.; CORNEA, C.; STEF, D. The correlaction of immune system activation with length of alcohol addiction in patients with alcoholic liver disease. *J. Hepatol*. v. 36, p. 145, May-Jul, 2002.

CULVERHOUSE, R. et al. Long-term stability of alcohol and other substance dependence diagnoses and habitual smoking: An evaluation after 5 years. *Arch. Gen. Psych*. v. 62, p. 753-760, Jan, 2005.

DELUCA, B.; CIOFFI, L. A.; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activitas Nerv. Sup.*, v. 19, p. 130-131, Oct, 1997.

DIAMOND, R.; GORDON, A. S. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev*. v. 77, n. 1, p. 1-20, Jan, 1997.

ESTRADA, G. et al. Prenatal ethanol exposure alters the expression of intestinal hydrolase mRNAs in newborn rats. *Alcoholism Clin. Exp. Res*. v. 20, n. 9, p. 1662-1668, Dec, 1996.

FENG, C. Z.; SARI, Y.; POWROZEK, T.; GOODLETT, C. R.; TING-KAI, L. Moderate Alcohol exposure compromises neural tube midline development in prenatal brain. *Develop. Brain Res.* v. 144, n. 1, p. 43-55, Apr, 2003.

GIBERSON, P. K. The effect of cold stress on lymphocyte proliferation in fetal ethanol-exposed rats. *Alcohol Clin Exp Res.* v.21 n. 8, p. 1440-1447, Aug, 1997.

GOODLETT, C.R.; HORN, K.H.; ZHOW, F.C. Alcohol teratogenesis: Mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp. Biol. Med.* v. 230, p. 394-406, Jun-Jul, 2005.

GUERRINI, I.; THOMSON, A.D.; GURLING, H.D. The importance of alcohol misuse, malnutrition and generic susceptibility on brain growth and plasticity. *Neurosc. Biobehav. Rev.* v. 31, p. 212-220, Aug, 2007.

HALASZ, I.; AIRD, F.; LI, L.; PRYSTOWSKY, M. B.; REDEI, E. Sexually dimorphic effects of alcohol exposure in utero on neuroendocrine and immune functions in chronic alcohol-exposed adult rats. *Moll Cell Neurosci.* v. 4, p. 343-353, Apr-May, 1993.

HANNIGAN, J. H. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* v. 55 n.4, p. 489-499, 1996.

JOSHI, S.; GAROLE, V.; DAWARE, M.; GIRIGOSAVI, S.; RAO, S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. *Metabolism.* v. 52, n. 1, p. 13-18, Jan, 2003.

LASO, F. J. *et al.* Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: Influence of ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res.* v. 20 n. 9, p. 1564-1568, Dec, 1996.

LIVANT, E. J.; WELLES, E. G.; EWALD, S. J. Chronic Ethanol Exposure Alters Leukocyte Subsets in Repopulating Spleens, But Does Not Alter Negative Selection in Thymuses of Sublethally Irradiated Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* v. 21. p. 1520, Nov, 1997.

LIMA, L.A.; MELO-JUNIOR, M.R.; CAVALCANTE, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T. Does the exposition to alcohol in pre and post-natal periods interfere on the formation and maturation of Peyer's patches? *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco.* v. 47, n. 1, p. 22-26, Jan, 2002.

LOPEZ, M. C.; HUANG, D. S.; BORGS, P.; WANG, Y.; WATSON, R. R.; Modification of lymphocyte subsets in the intestinal-associated immune system and thymus by chronic ethanol consumption. *Alcoholism: Clin. And Exp. Res.* v. 18 n.1, p. 8-11, Feb, 1994.

LOPEZ, M. C.; WATZL, B.; COLOMBO, L. L.; WATSON, R. R. Alterations in mouse Peyer's patch lymphocyte phenotype after ethanol consumption. *Alcohol.* v. 14 n. 2, p. 107-110, 1997.

MELO-JÚNIOR, M. R.; LIMA, L.A.; CAVALCANTE, C.L.B.; PONTES FILHO, N. T. Alterações esplênicas na exposição pré e pós-natal ao álcool: Um estudo histomorfométrico. *Anais da Faculdade de Medicina do Centro de Ciências da Saúde da UFPE*, Recife, v. 46, n. 1, p. 8-13, Feb, 2001.

MELO-JÚNIOR, M. R.; MACHADO, M.C.F.P.; ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; BELTRÃO, E.I.C.; PONTES FILHO, N.T. Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. *Rev. Paraense Med.* v. 20, n. 4, p. 7-12, Oct-Dec, 2006.

REESES, C.;POLISH, J. Alcoholism risk and P300 event-related brain potential: Modality, Task and gender effects. *Brain Cognit.* v. 53 n.1, p. 46-57, Sept, 2003.

ROTH, D. R. *et al.* Design and evaluation of immunotoxicity studies. *Experimental and Toxicologic Pathology.* v. 57, p. 367-371, Mar 2006.

SANTOS, O. C. *Estudo imunohistoquímico das áreas linfocitárias no foliculo de baços em esquistossomóticos hepato-esplênicos submetidos a esplenectomia e ligadura de varizes esofagianas.* 1991. 72p. Tese (Mestrado) CCS- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

SHER, L. Effects of heavy alcohol consumption on the cardiovascular system may be mediated in part by the influence of alcohol-induced depression on the immune system. *Medical Hypotheses*. v. 60 n.5, p. 702-706, May, 2003.

SHIBLEY, I. A.; McINTYRE, T. A.; PENNINGTON, S. N. Experimental models used to measure direct and indirect ethanol teratogenicity. *Alcohol and Alcoholism*. v. 34, p. 125-140, 1999.

SILVA, B. P. F. *et al.* Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos. *Rev. Pa. Med.* v. 20 n.1, p. 7-16, Jul, 2006.

SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defense. *Alcohol and Alcoholism*. v. 34 n. 6, p. 830-841, Jun, 1999.

WANG, J. F.; SPITZER, J. J. Alcohol-induced thymocyte apoptosis is accompanied by impaired mitochondrial function. *Alcohol*. v. 14 n. 1, p. 99-105, Feb, 1997.

WATZL, B.; Watson, R. R. Symposium: Nutrition, immunomodulation and AIDS. Role of alcohol abuse in nutritional immunosuppression. *Am. Inst. Nut.* v. 33, p. 773-737, Sept, 1992.

WORLD, M. J.; RYLE, P. R.; THOMSON, A. D. Alcoholic malnutrition and the small intestine. *Alcohol Alcoholism*. v. 20, p. 89-124, Nov, 1985.

ZHU, X.; SEELIG, L. L. Developmental aspects of intestinal intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the rat following placental and lactational exposure to ethanol. *Alcohol Alcoholism*. v. 35 n.1, p.25-30, Jan, 2000.