

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

ANA CLÁUDIA CARVALHO DE ARAÚJO

**“INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA MELATONINA NA DINÂMICA SANGUÍNEA DE
RATAS PRENHAS E NA HISTIGÊNESE DO BAÇO E TIMO DA PROLE”**

Recife

2011

ANA CLÁUDIA CARVALHO DE ARAÚJO

**“INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA MELATONINA NA DINÂMICA SANGUÍNEA DE
RATAS PRENHAS E NA HISTIGÊNESE DO BAÇO E TIMO DA PROLE”**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Biociência Animal. Área de
Morfofisiologia**

Orientadora:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Recife

2011

Ficha Catalográfica

A663i Araujo, Ana Cláudia Carvalho de
 Investigação da ação da melatonina na dinâmica
 sanguínea de ratas prenhas e na hitigênese do baço e timo
 da prole / Ana Cláudia Carvalho de Araujo. -- 2011.
 54 f.: il.

 Orientador: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.
 Dissertação (Mestrado em Biociência Animal)
 – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
 de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2011.
 Referências.

 1. Morfologia veterinária 2. Melatonina 3. Hemograma
 4. Órgão de defesa 5. Animais de laboratório 6. Rato
 I. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, Orientador II. Título

CDD 636.0892

ANA CLÁUDIA CARVALHO DE ARAÚJO

**“INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA MELATONINA NA DINÂMICA SANGUÍNEA DE
RATAS PRENHAS E NA HISTIGÊNESE DO BAÇO E TIMO DA PROLE”**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal. Área de Morfofisiologia

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

Prof. Dr. Edson João da Silva - UFRPE

“Dedico este trabalho a meus queridos Pais, Irmão, Cunhada e amados Sobrinhos pelo apoio nos momentos mais difíceis”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me permitir realizar tudo que sonhei até este ponto de minha vida. Também a Ele agradeço a presença de pessoas especiais, citadas a seguir, que de alguma forma sempre me apoiaram para que meu sonho se realizasse.

Em segundo lugar, agradeço a meus pais, Aldenir Silva de Araújo e Majupira Carvalho de Araújo, que sempre estiveram e sempre estarão ao meu lado nos bons ou nos maus momentos, sem medirem esforços diante das dificuldades que precisem enfrentar para me apoiar.

Quero ressaltar um infindo agradecimento a meus orientadores, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira, que me possibilitaram adquirir o nível de conhecimento e a experiência que tenho agora. Também lhes agradeço pela paciência, tempo dedicado e momentos agradáveis.

Tenho muito a agradecer a meu irmão, Aldenir Carvalho, a minha cunhada, Normanda Suzi e a meus queridos e amados sobrinhos, Kiara e Kevin, por todo amor e dedicação que me proporcionam.

Agradeço aos meus avós maternos, Evilásio Fernandes e Maria de Lourdes e paternos, Amara Silva e Rui Carneiro, alguns deles não mais presentes, tendo a certeza de que sempre, de onde estão, olham e torcem por mim. Aos meus familiares, tios e primos, dos quais não posso citar os nomes, pois umas três páginas seriam insuficientes, igualmente agradeço.

Sou estritamente grata a Fernanda das Chagas, Janaina Jeanine, Hilda Michelly, Welma Emídio e Ismaela Melo pela ajuda, que possibilitou a conclusão

deste trabalho. Agradeço ainda a Franklin Magliano, Gyl e Carina Helena que também me auxiliaram na realização deste trabalho.

Não tenho palavras para expressar meus agradecimentos a Paulo Estevão pelo apoio para realização deste projeto, sem o qual não teria conseguido. Agradeço também pelos momentos bons e ruins que tivemos juntos e pelo apoio que demos um ao outro.

Agradeço imensamente a minha melhor AMIGA Vanessa de Castro por todo apoio psicológico e por diversas vezes ter ido ao laboratório me ajudar. Agradeço ainda as minhas Amigas Janaína de Souza, Marcilene Lemos e Vivian Santana que de alguma forma também contribuíram para a realização deste trabalho;

Sou Grata também ao Grupo de Ajuda a Criança Carente com Câncer (GAC), pois foi lá junto com minhas crianças, muitas das quais já se foram, que aprendi a dar mais valor a vida e que por pior que seja meu sofrimento nem se compara ao destas crianças.

Recebam meus agradecimentos:

Os queridos colegas, muitos dos quais posso chamar de amigos, do Laboratório de Histologia: Ana Paula, Solange, Andressa, Lílian, Thiago, Alicely, Rose, Lílian (monitora), e aos “novos” estagiários: Fernanda, Carolina, Shimene, Clóvis, Cintia, Rebeka, Pauline, os quais contribuíram para realização de meus experimentos e/ou tornaram o ambiente do laboratório agradável e divertido;

O professor Anísio Soares pelo auxílio na parte experimental e no fornecimento de materiais e equipamentos. As meninas da rotina do hospital veterinário que me ensinaram muito da parte experimental do meu trabalho;

O funcionário Marcos André Santos de Souza, excelente pessoa e profissional dedicado, responsável pelo biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, bem como as estagiárias Danielle e Gabriela;

Os que compõem o Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Histologia, por terem cedido às instalações e os animais para realização desse trabalho, bem como ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal pela oportunidade;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, pela oportunidade de realização do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Especialização em Morfofisiologia Animal Aplicada a Educação e Mestrado em Biociência Animal.

Meus agradecimentos também ao programa de bolsas FACEPE.

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa.

RESUMO

Diversos fatores podem interferir no sistema imune, dentre eles podemos citar a influência dos hormônios. Entre os hormônios que provocam alterações no sistema imune pode-se citar a melatonina. As interações entre a melatonina e o sistema imunológico têm sido bastante estudadas, e em praticamente todos os casos, a melatonina mostrou ter efeitos imunomoduladores da resposta imune. Entretanto, não é conhecido o papel desempenhado por esse hormônio durante a gestação. Assim, a pesquisa objetivou analisar a influência da melatonina exógena pinealectomia em ratas prenhas sobre o hemograma materno e fetal, histogênese e morfometria do baço e timo da prole. Foram utilizadas 40 ratas, os quais foram divididos em 4 grupos: G I – acasaladas e mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 (controle); G II – ratas sham-pinealectomizadas; G III – ratas pinealectomizadas tratadas com placebo; G IV – ratas pinealectomizadas tratadas com melatonina. Após a realização da pinealectomia e confirmação do acasalamento, a melatonina foi administrada na dosagem 0,5 mg/Kg via intraperitoneal, sendo dissolvida em 0,1 mL de etanol e 0,3 mL de solução salina. O sangue das fêmeas foi coletado no 7º, 14º e 21º dia de prenhez e dos filhotes aos 10 dias de nascimento, sendo retirado um volume de 500µL. O hematócrito foi determinado pelo método de microhematócrito, a contagem total de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, enquanto que a contagem diferencial de leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo. O baço e o timo dos filhotes foram coletados no 1º, 5º e 10º dia após nascido. Estes foram incluídos em parafina e os cortes histológicos foram submetidos a histoquímica e morfometria. Os resultados mostraram que a ausência da melatonina promove alterações no hemograma no terço final da gestação, e modificações morfológicas e morfométricas no timo e baço nos 1º e 5º dia de vida da prole. Concluiu-se que a melatonina materna é importante para regulação do hemograma em ratas prenhas, e no desenvolvimento normal do baço e timo da prole.

PALAVRAS-CHAVE: Melatonina, hemograma, prenhez, órgãos de defesa, imunidade

ABSTRACT

Many factors can interfere in immune system among them we can quote the hormones influence. Between the hormones that provoke alterations in the immune system we can quote melatonin. The interactions between melatonin and immunologic system have been studied a lot, and in practically all the cases, melatonin showed to have immunomodulator effects of immune response. Meantime it is not known the play rolled by this hormone during gestation. Thus this research had as objective analyze the influence of pinealectomy in pregnant rats about the maternal and fetal hemograms, histogenesis and morphometry of thymus and spleen of offspring. It was used 40 rats that were divided in 4 groups: G I – control; G II – sham-pinealectomyzed rats; G III – pinealectomyzed rats treated with placebo; G IV – pinealectomyzed rats treated with melatonin. After the realization of pinealectomy and confirmation of pregnancy, melatonin was administrated in dosage of 0.5mg/Kg in a intraperitoneal way, that was diluted in 0.1 mL of ethanol and 0.3 mL of saline solution. Blood was collected in 7th, 14th and 21th day of pregnancy and the puppies in the 10th day after born, it was collected 500µL. The hematocrit was determinate by the method of microhematocrit, the total count of red blood cells and leukocytes was realized in Neubauer chamber and differential count of leukocytes was carried out through blood smear. The spleen and thymus of offspring was collected in the 1st, 5th and 10th day after born. Theses organs were included in paraffin and the Histological cuts were submitted to histochemistry and morphometry. The results showed that absence of melatonin takes to alterations in the hemogram in the final third of gestation and morphological and morphometrical modifications in thymus and spleen in the 1st and 5th days of life of offspring. It was concluded that maternal melatonin is important to regulation of hemogram in pregnant rats an in the normal development of thymus and spleen of offspring.

KEYWORDS: Melatonin, hemogram, pregnancy, defense organs, immunity

SUMÁRIO

Capítulos	Pág.
AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
I INTRODUÇÃO.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
II Efeito da pinealectomia sobre parâmetros hematológicos de ratas prenhas e na histogenese do baço e timo da prole.....	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Nos mamíferos o sistema imunológico apresenta uma variedade de diferentes componentes e níveis de organização distribuídos por todo corpo agindo para eliminar vírus, bactérias, fungos, e até mesmo tumores (ROSS; PAWLINA, 2008). O sistema imune é capaz de realizar uma resposta rápida e efetiva, sendo realizada pelo sistema imune inato, ou de produzir uma resposta mais lenta e duradoura, pelo sistema imune adaptativo (SILVA, 2001).

O sistema imune inato forma a primeira linha de defesa, sendo não-específico, enquanto o sistema imune adaptativo é capaz de reconhecer e memorizar agentes patogênicos específicos. Em ambas respostas as células imunes se comunicam entre si e com outras células através das citocinas, que são produzidas por diferentes tipos de células imunes, as quais também respondem as substâncias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ROSS; PAWLINA, 2008). Além disso, em ambos os sistemas há a participação de leucócitos, sendo os macrófagos (células derivadas dos monócitos), basófilo, neutrófilo e eosinófilo as células imunes mais atuantes na imunidade inata ou natural, enquanto que na imunidade adaptativa são os linfócitos.

O sistema imune inato responde rapidamente tanto a moléculas endógenas como exógenas sem que haja a necessidade de contato prévio com o organismo agressor (PISETSKY, 2008). Este sistema é constituído pelo sistema complemento e diversos tipos celulares especializados tais como macrófagos, mastócitos, granulócitos e células dendríticas (PISETSKY, 2008). Já o sistema imune adaptativo tem a capacidade de reconhecer, combater e produzir uma memória contra tipos específicos de antígenos. Os efetores do sistema imune adaptativo são os linfócitos T e B. A resposta das células T ao reconhecimento do antígeno específico envolve a produção de citocinas, ativação dos linfócitos B e memorização do antígeno. Os linfócitos B ao serem ativados diferenciam-se em plasmócitos, que têm como papel principal produzir anticorpos específicos para o antígeno (PARIJS; ABBAS, 1998; VAZ et. al., 2003).

Na vida intra-uterina as células sanguíneas são produzidas primeiramente no mesoderma do saco vitelino, e posteriormente no fígado e no baço, que continuam a produzir estas células até cerca de duas semanas após o nascimento (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Durante a infância e a vida adulta as células sanguíneas têm sua origem a partir de células tronco da medula óssea e a maturação tanto dos eritrócitos como dos granulócitos tem início na medula óssea e termina nos vasos sanguíneos. Já a maturação dos agranulócitos, ou seja, linfócitos e monócitos têm início na medula óssea e termina no timo e tecido conjuntivo, respectivamente. Porém, os linfócitos B também têm origem a partir das células tronco da medula óssea, no entanto sua maturação se inicia na medula e termina nos órgãos linfóides secundários, como o baço (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Na região cortical do timo as células tronco originadas da medula óssea proliferam e após estarem totalmente diferenciadas migram para região medular por onde deixam o timo, através de vênulas (OVALLE; NAHIRNEY, 2008). A principal função do timo é fornecer ambiente adequado para diferenciação, seleção e maturação dos linfócitos T, que migrarão para os órgãos linfóides secundários, principalmente durante o período embrionário e fetal, e nos primeiros meses após o nascimento (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

O baço é o maior órgão linfóide do organismo que está conectado a circulação sanguínea, sendo bastante importante no combate de patógenos que penetram no corpo através da circulação sanguínea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; OVALLE; NAHIRNEY, 2008). Além disso, o baço apresenta outras funções tais como destruição dos eritrócitos e plaquetas envelhecidos e formação de linfócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; BALESTIERI, 2006).

Segundo Balestieri (2006) diversos fatores podem interferir no sistema imune, dentre eles podemos citar a espécie, raça ou linhagem, sexo, idade, nutrição e hormônios. Entre os hormônios que provocam alterações no sistema imune podemos citar a melatonina, que é um neuro-hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, sendo sintetizado e secretado normalmente durante a noite em várias espécies. A melatonina tem como principais funções fisiológicas informar sobre os ciclos diários de luz e escuro ao organismo e controlar o período anual da função

reprodutiva em mamíferos que se reproduzem sazonalmente (LEE et. al., 2003; ANISIMOV, 2003; BERGER, 2008).

Vários estudos têm revelado que a melatonina apresenta propriedades imunomodulatórias e que atua tanto sobre a imunidade inata quanto sobre a adquirida (NELSON, 2004; SILVA, 2005; SRINIVASAN et. al., 2005; SOUSA-NETO; SCALDAFERRI 2005; BERGER, 2008). Na imunidade inata a melatonina atuaria aumentando a produção de citocinas, enquanto que na imunidade humoral aumentaria o número de células imunocompetentes. Sabe-se ainda que a melatonina tem receptores de alta afinidade em diversas células e órgãos do sistema imune em roedores, galinhas e humanos, incluindo o baço e o timo (POON; PANG, 1992; PANG et. al., 1995; TAMURA, 2009).

A literatura relata que o fotoperíodo, a pinealectomia e administração de doses farmacológicas de melatonina exógena também podem modular vários parâmetros imunológicos, afetando diretamente as funções do timo e baço (CARDINALI et. al., 1997; ATRE; BLUMENTHAL, 1998; RAI; HALDAR, 2003; AHMAD; HALDAR, 2010). Além disso, a interrupção da liberação noturna da melatonina abole completamente a proliferação das Unidades Formadoras de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (CFU-GM) da medula óssea (HALDAR; HAUSSLER; GUPTA 1991, 1992; RAI; HALDAR; SINGH, 2009).

De acordo com Lanoix; Ouellette; Vaillancourt (2006) e Maekawa et. al. (2007) a melatonina passa pela placenta sem sofrer alteração e em ratas prenhas os níveis de séricos deste hormônio aumentam do 12º ao 21º dia de gestação, ocorrendo um rápido declínio destes níveis logo após o parto. Na literatura poucas pesquisas têm demonstrado a ocorrência de alterações na função imune em ratas durante a prenhez. Faas et. al. (2000; 2005) relataram que os linfócitos, monócitos e granulócitos mostram um fenótipo ativo em ratas, especialmente na última semana de gestação, e uma diminuição nas subpopulações de linfócitos. Assim, a pesquisa teve o objetivo de esclarecer a participação da melatonina sobre o hemograma de ratas prenhas e na histogênese do timo e baço na prole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, R.; HALDAR, C. Photoperiodic regulation of mt1 and mt2 melatonin receptor expression in spleen and thymus of a tropical rodent *Funambulus pennanti* during reproductively active and inactive phases. **Chronobiology International**, v. 27, n. 3, p. 446 - 462, 2010.
- ANISIMOV, V.N. Effects of Exogenous Melatonin - A Review. **Toxicologic Pathology**, v. 31, p. 589 – 603, 2003.
- ATRE, D.; BLUMENTHAL, E.J. Melatonin: immune modulation of spleen cells in young, middle-aged and senescent mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 103, n. 3, p. 255 – 268, 1998.
- BALESTIERI, F.M.P. **Imunologia**. São Paulo. Manole, p. 3 – 21, 2006.
- BERGER, J. A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. **Pathologie Biologie**, v. 56, p. 286 – 291, 2008.
- CARDINALI, D.P.; CUTRERA, R.A.; BONACHO, M.G.; ESQUIFINO, A.I. Effect of pinealectomy, superior cervical ganglionectomy, or melatonin treatment on 24-hour rhythms in ornithine decarboxylase and tyrosine hydroxylase activities of rat spleen. **Journal of Pineal Research**, v. 22, n. 4, p. 210 – 220, 1997.
- FAAS, M.M.; BOUMAN, A.; NIEUWENHOVEN, A.L.V.V.; SCHAAF, G.V.D.; MOES, H.; HEINEMAN, M.J.; VOS, P. Species differences in the effect of pregnancy on lymphocyte cytokine production between human and rat. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 946 – 953, 2005.
- FAAS, M.M.; SCHUILING, G.A.; LINTON, E.A.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C. W.G. Activation of peripheral leukocytes in rat pregnancy and experimental pre-eclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, p. 351 – 357, 2000.
- HALDAR, C.; HAUSSLER, D.; GUPTA, D. Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. **Journal Pineal Research**, v. 12, p. 79 – 83, 1992.
- HALDAR, C.; HAUSSLER, D.; GUPTA, D. Response of colony forming units for granulocyte macrophages (CFU-GM) of intact and pinealectomized rat bone marrow cells to murine recombinant interleukin-3 (rIL-3), recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) and human recombinant erythropoietin (rEPO). **Progress in Brain Research**, v. 91, p. 323 – 325, 1991.
- HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E.; MOSS, P.A.H. **Fundamentos em hematologia**. 4 ed. São Paulo. Artmed, p. 9 – 35, 2001.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 390 – 448, 2004.
- LANOIX, D.; OUELLETTE, R.; VAILLANCOURT, C. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 1981 – 1989, 2006.
- LEE, C.K.; MOON, D.H.; SHIN, C.S.; KIM, H.; YOON, Y D.; KANG, H.S.; LEE, B.J.; KANG, S.G. Circadian expression of Mel1a and PL-II genes in placenta: effects of

- melatonin on the PL-II gene expression in the rat placenta. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 200, n. 1/2, p. 57 - 66, 2003.
- LIMA, F.A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.O. papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria**, v. 29, n. 1, p. 33 – 42, 2007.
- MAEKAWA, R.; TAMURA, H.; TANIGUCHI, K.; TAKETANI, T.; SUGINO, A. Role and regulation of maternal melatonin during pregnancy in rats. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 105 – 110, 2007.
- NELSON, R.J: Seasonal immune function and sickness responses. **Trends Immunology**, v. 25, p. 187 – 192, 2004.
- OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C. **Netter - Bases da Histologia**. 1ª Ed. Rio de Janeiro. Sauders-Elsevier, p. 195 - 212, 2008.
- PANG, C.S.; TANG, P.L.; PANG, S.F.; BROWN, G.M. Comparison of the pharmacological characteristics of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the lung, spleen, brain and kidney of chicken. **Biology Signals**, v. 4, p. 311 – 324, 1995.
- PARIJS, L.V.; ABBAS, A.K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, v. 280, p. 243 - 248, 1998.
- PISETSKY, D.S. The role of innate immunity in the induction of autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, p. 69 – 72, 2008.
- POON, A.M.S.; PANG, S.F. 2[¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. **Life Science**, v. 50, p. 1719 – 1726, 1992.
- RAI, S.; HALDAR, C.; SINGH, R. Modulation of immunity in young-adult and aged squirrel, *Funambulus pennanti* by melatonin and p-chlorophenylalanine. **Immunity & Ageing**, v. 6, n. 5, p. 1 - 8, 2009.
- RAI, S.; HALDAR, C. Pineal Control of immune status and hematological changes in blood and bone marrow of male squirrels (*Funambulus pennanti*) during their reproductively inactive phase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.136, p. 319 – 328, 2003.
- ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia – Texto e Atlas**. 5ª Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 399 - 443, 2008.
- SILVA, L.N.C. **Engenharia Imunológica: desenvolvimento e Aplicação de ferramentas computacionais inspiradas em sistemas imunológicos artificiais**. São Paulo, 2001. [Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação].
- SILVA, S.O. **Oxidação de melatonina e formação de N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina: possíveis efeitos biológicos**. São Paulo, 2005 [Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo].
- SOUSA-NETO, J.A.; SCALDAFERRI, P.M. Melatonina e câncer – revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 1, p. 49 – 58, 2005.
- SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.M.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I.; PANDI-PERUMAL, S.R.; MILLER, S.C. Melatonin, immune function and aging. **Immunity & Ageing**, v. 17, n. 2, p. 1 – 10, 2005.

TAMURA, E.K. **Efeito da melatonina sobre a produção endotelial de óxido nítrico in vitro e in vivo**. São Paulo, 2009 [Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo].

VAZ, N.M.; FARIA, A.M.C.; VERDOLIN, B.A.; SILVA NETO, A.F.; MENEZES, J.S.; CARVALHO, C. R. The conservative physiology of the immune system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 13 – 22, 2003.

CAPÍTULO II

Investigação da ação da melatonina na dinâmica sanguínea de ratas prenhas e na histogênese do baço e timo da prole.

Investigation of melatonin action on blood dynamics of pregnant rats and the histogenesis of thymus and spleen of the offspring.

A. C. C. Araújo^a; P. E. A. Vilaça-Junior^a; A. F. Soares^b; V. Wanderley-Teixeira^b; A. J. J. M. Lemos^a; F. A. C. Silva^a; A. A. C. Teixeira^{b*}

^a Pós-graduandos do Programa em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Brasil.

^b Professores do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE- Brasil.

*Contato: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, CEP 52171-900. Tel.: (81) 3320.6389. E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br

RESUMO

As interações entre a melatonina e o sistema imunológico têm sido bastante estudadas, e em praticamente todos os casos, a melatonina mostrou ter efeitos imunomoduladores na resposta imune. Entretanto, não é conhecido o papel desempenhando por esse hormônio sobre o sistema imune durante a gestação. Assim, a pesquisa objetivou analisar a influência da pinealectomia em ratas prenhas sobre o hemograma materno e fetal, histogênese e morfometria do baço e timo da prole. Foram utilizadas 40 ratas, os quais foram divididos em 4 grupos: G I – acasaladas e mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 (controle); G II – ratas sham-pinealectomizadas; G III – ratas pinealectomizadas tratadas com placebo; G IV- ratas pinealectomizadas tratadas com melatonina. A melatonina foi administrada durante toda gestação na dosagem 0,5 mg/Kg, sendo dissolvida em 0,1 mL de etanol e 0,3 mL de solução salina. O sangue materno foi coletado no 7º, 14º e 21º dia de prenhez e dos filhotes aos 10 dias de nascimento, para análise do hematócrito, contagem total de hemácias e contagem total e diferencial dos leucócitos. Cortes histológicos do baço e timo da prole foram utilizados para histoquímica e morfometria. Os resultados mostraram que a ausência da melatonina promove alterações no hemograma no terço final da gestação, e a modificações morfológicas e morfométricas no timo e baço nos primeiros dias de vida da prole. Concluiu-se que a melatonina materna é importante para regulação do hemograma em ratas prenhas, e no desenvolvimento normal do baço e timo da prole.

PALAVRAS-CHAVE: Melatonina, hemograma, prenhes, órgãos de defesa, imunidade

ABSTRACT

The interactions between melatonin and immunologic system have been studied a lot, and in practically all cases, melatonin showed has immunomodulators effects in the immune response. Meantime it is not known the play rolled by this hormone during gestation. Thus this research have as objective analyze the influence of pinealectomy in pregnant rats about the maternal and fetal hemogram, histogenesis and morphometry of thymus and spleen of offspring. It was used 40 rats that were divided in 4 groups: G I – control; G II – sham-pinealectomyzed rats; G III – pinealectomyzed rats treated with placebo; G IV – pinealectomyzed rats treated with melatonin. Melatonin was administrated in dosage of 0,5mg/Kg, that was diluted in 0,1 mL of ethanol and 0,3 mL of saline solution. The blood was collected in 7th, 14th and 21th day of pregnancy and the puppies in the 10th day after born for hematocrit analysis, total count of red blood cells and total and differential count of leukocytes. Histological cuts of spleen and thymus of offspring were utilized for histochemistry and morphometry. The results showed that absence of melatonin promotes alterations in the hemogram in the final third of gestation and morphological and morphometrical modifications in thymus and spleen in the firsts days of life. It was concluded that maternal melatonin is important to regulation of hemogram in pregnant rats and in the normal development of thymus and spleen of offspring.

KEYWORDS: Melatonin, hemogram, pregnancy, defense organs, immunity

1. Introdução

Durante a gestação em mamíferos ocorre uma ampla modulação da função tanto do sistema imune inato quanto do humoral (Markert et al., 2005; Sargent et al., 2006). Esta imunomodulação sistêmica promove simultaneamente uma redução da atividade imunológica celular, da tolerância a diversos antígenos, porém aumenta a resposta inflamatória (Shakhar et al., 2007).

Em humanos a imunomodulação caracteriza-se por um aumento do número de leucócitos (Veenstra Van Nieuwenhoven et al., 2003), supressão da citotoxicidade das células natural killer (Baley e Schacter, 1985; Gabrilovac et al., 1988), aumento do número de células T regulatórias (Somerset et al., 2004) e aumento da expressão de diversas moléculas de adesão associadas à ativação de granulócitos e monócitos (Veenstra Van Nieuwenhoven et al., 2003).

A modulação do sistema imune pode ser afetada por diversos fatores inclusive pela presença de hormônios como é o caso da melatonina, um hormônio produzido pela pineal durante o período noturno onde parece estimular o sistema imunológico aumentando a mobilidade e a atividade das células de defesa, promove a formação dos anticorpos e conseqüentemente aumentando as defesas contra microrganismos (Macchi e Bruce, 2004; Claustrat et al., 2005).

Na gestação a produção e concentração sérica de melatonina mostra uma mudança gradual, atingindo valores elevados no final desse período, sugerindo que esse hormônio desempenhe um importante papel na manutenção da gestação (Bishnupuri e Haldar, 2000/01; Nakamura et al., 2001). Esta indoleamina lipofílica atravessa a placenta livremente sem ser alterada, atingindo a circulação fetal com facilidade fornecendo informações fotoperiódicas para o feto, influenciando assim o fotoperíodo pré-natal através dos receptores deste hormônio em diversos tecidos, mediando às interações fisiológicas fetais, dentre elas funções

imunológicas (Klein, 1972; Reppert et al., 1979; Yellon e Longo, 1988; Weaver et al., 1988; Goldman, 2003).

Estudos mostram que ratos submetidos à administração de melatonina pela via oral apresentam aumento na atividade proliferativa de linfócitos, na síntese de DNA em linfócitos tímicos e esplênicos, e na produção de citocinas por macrófagos em ratos portadores de tumor (Martins et al., 1998; El-Sokkary et al., 2003; Santello, 2005). Além disso, o fotoperíodo, a pinealectomia e melatonina exógena podem afetar o peso e as funções do timo e baço em mamíferos e aves (Maestroni, 2002; Pertsov, 2006; Wronka et al., 2008).

As interações entre a melatonina e o sistema imunológico têm sido bastante estudadas, e em praticamente todos os casos, a melatonina mostrou ter efeitos imunomoduladores da resposta imune (Maestroni et al., 1994; Maestroni et al., 1994; Garcia-Maurino et al., 2000; Esquifino et al., 2004; Faas et al., 2000/05). Entretanto, não é conhecido o papel desempenhando por esse hormônio durante a gestação. Assim, a pesquisa objetivou analisar a influência da melatonina exógena sobre o hemograma materno e fetal, histogênese e morfometria do baço e timo da prole.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 200g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As fêmeas foram mantidas em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*, temperatura de 22°C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40 W), que estabeleceu o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas. O respectivo projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRPE. As fêmeas foram divididas, ao acaso, em quatro grupos.

Grupo I - ratas acasaladas e mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 (controle).

Grupo II - ratas sham-pinelectomizadas, acasaladas e mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 h.

Grupo III - ratas pinelectomizadas, acasaladas, mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 h e tratadas com placebo.

Grupo IV - ratas, pinelectomizadas, acasaladas, mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 h e tratadas com melatonina.

2.1 Acasalamento dos Animais e Diagnóstico da Prenhez

As fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para três fêmeas, sempre no início da noite (18h). Na manhã do dia seguinte sempre às 06h, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença

de espermatozoides nos esfregaços. Para a coleta do material foram utilizadas hastes de algodão umedecidas em solução salina. Logo após a colheita do material, as células foram transferidas para lâminas histológicas através de um movimento rotatório da haste. Essas lâminas foram imediatamente mergulhadas numa mistura de álcool-éter em partes iguais e, em seguida, coradas pelo método Shorr-Harris.

2.2 Pinealectomia

A pinealectomia foi realizada nas fêmeas previamente anestesiadas com atropina (1 mL) diluída em 1 mL de água destilada, sendo administrado 0,2 mL da solução via intraperitoneal. Em seguida foram administrados 0,2 mL de xilazina (40 mg/mL) e 0,2 mL de quetamina (80 mg/mL), também por via intraperitoneal. Em seguida, foi feita a tricotomia, assepsia da calota craniana, abertura da pele e do tecido subcutâneo, até a exposição do ponto lambda. Com o auxílio de um micromotor de baixa rotação e de uma broca odontológica nº 5 foi retirado um fragmento circular da calota craniana (± 4 mm de diâmetro), em seguida foi feita a ligadura do seio venoso e, com o auxílio de uma lupa e uma pinça de relojoeiro (nº 2), a glândula pineal foi removida. Em seguida, o encéfalo foi recoberto com o fragmento ósseo e a pele suturada (Kuszek e Rodin, 1977). Após a retirada da pineal, esta foi fixada em líquido Bouin e processada para inclusão em parafina, para posteriormente ser confirmada através da microscopia de luz. O mesmo procedimento foi realizado com as fêmeas do grupo II (sham-pinealectomizadas), porém sem a retirada da glândula pineal, com o objetivo de eliminar falsos resultados devido à ação do procedimento cirúrgico.

2.3 Tratamento com melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) foi administrada por via intraperitoneal entre as 17h e 18h durante toda gestação (Subramanian et al., 2007). A dose de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) administrada foi de 0,5 mg/Kg, que foi dissolvida em 0,1 mL de etanol e 0,3 mL de solução salina sendo preparada diariamente. Como placebo foi administrado às ratas do grupo III a mesma concentração de solução de etanol e salina.

2.4. Coleta de sangue

O sangue foi coletado no 7^o, 14^o e 21^o dia de prenhez por meio de contenção mecânica (Fluttert et al., 2000; Silva et al., 2006). Foi realizada a punção da veia lateral caudal com uso de agulha escalpe (27G), sendo retirado um volume de 500µL acondicionado em um tubo com anticoagulante (heparina sódica) e mantido à temperatura ambiente, sendo em seguida homogeneizado com delicadeza até garantir perfeita homogeneização da amostra. Para coleta de sangue dos filhotes os mesmos foram anestesiados com pentobarbital 40mg/kg por via intraperitoneal (Lang et al., 1987; Penicaud et al., 1987; Lima et al., 2005; Lacerda et al., 2007), e coletado o mesmo volume de sangue por punção cardíaca aos 10 dias de nascimento.

2.4.1 Hematócrito

Um tubo de micro-hematócrito (capilar com 75 mm) de cada amostra foi preenchido com sangue até aproximadamente $\frac{3}{4}$ de sua capacidade. Este foi submetido à centrifugação (centrifuga Sigma modelo 1-15) a 6000 rpm por 5 minutos. A altura da coluna de hemácias e

leucócitos foi medida como percentagem da coluna de sangue total em cartão especial para leitura de hematócrito (Gomes et al., 2006).

2.4.2 Contagem total de hemácias

As hemácias foram contadas em microscópio de luz utilizando-se o aumento de 40x, em amostra de sangue cuidadosamente diluída em líquido de Hayen na proporção de 1:400 em câmara de Neubauer. Na sequência, os resultados foram submetidos à fórmula: $Hm \times 5 \times 400 \times 10$, onde: Hm é o número total de hemácias contadas (em $1/5 \text{ mm}^2$), 5 é o fator para 1 mm^2 , 400 é o fator de conservação da diluição e 10 é o fator para 1 mm^3 (profundidade da lâmina) (Vallada, 1999).

2.4.2 Contagem total e diferencial dos leucócitos

Para contagem do número total de leucócitos 0,1 mL de sangue foi diluído em solução de TURK (ácido acético a 3%) que possui propriedade de destruir as hemácias e corar ligeiramente o núcleo dos leucócitos. Os leucócitos foram quantificados em câmara de Neubauer e o resultado foi submetido à seguinte fórmula: $\text{leucócitos/mm}^3 \text{ de sangue} = Lc \times 20 \times 10 / 4$, onde Lc é o número total de leucócitos contados em 4 mm^2 , 4 é o fator para 1 mm^2 , 20 de diluição utilizada e 10 para 1 mm^3 (profundidade da lâmina) (Vallada, 1999).

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada partindo-se da técnica do esfregaço sanguíneo corado pelo Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda, Após a secagem, os esfregaços foram analisados ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), sendo contadas 100 células através de movimentos de ziguezague sobre a lâmina em um único sentido. Os diferentes elementos foram contabilizados através da utilização de um contador

eletrônico. Foram realizados também esfregaços sanguíneos que foram corados pela técnica de Sudan Black 1,4%, coloração bastante útil na diferenciação de leucemias agudas.

2.5. Análise morfológica e histoquímica do baço e do timo

Três ratos de cada fêmea dos grupos experimentais foram eutanasiados no 1^o, 5^o e 10^o dia de nascido. Para tanto, os filhotes foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular. Em seguida, foi realizada a abertura da cavidade abdominal desde o púbis até a parte superior do esterno. O estômago foi, então, puxado para fora da cavidade abdominal, expondo-se o baço, sendo cortadas às ligaduras do pedículo vascular esplênico, para remoção do mesmo. O timo foi retirado posteriormente ao afastamento dos pulmões e remoção do tecido peritímico. Após a coleta o baço e o timo foram mergulhados imediatamente em líquido de Bouin permanecendo no mesmo por 48 horas. Após esses procedimentos, os órgãos foram clivados, obtendo-se fragmentos, os quais foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para 5 µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Mallory (fibras colágenas), Orceína (fibras elásticas) Impregnação argêntica (fibras reticulares) e analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50. As reações de colorações foram classificadas como intensa (++) , moderada (±) e fraca (+). Após a coleta foi realizada a eutanásia dos filhotes utilizando-se câmara de CO₂.

2.6. Análise morfométrica

Para a morfometria do baço e timo dos filhotes realizou-se a captura de imagens por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao do programa ImagemLab 2000 para Windows. Na captura, foram utilizadas cinco lâminas coradas pelo tricrômico de Mallory de cada grupo. Para o baço foram medidos 10 (dez) corpúsculos esplênicos dos filhotes/dia de nascido, de cada grupo experimental, para determinação em micrometros (μm) dos seguintes parâmetros: área, diâmetro máximo e diâmetro mínimo (Pereira et al., 2002; Golalipour et al., 2008). A contagem das células hematopoiéticas foi realizada utilizando-se um retículo contendo 100 pontos, acoplado a uma ocular de 10x e analisado com objetiva de 40x (Weibel et al., 1966). Foram contados os pontos que incidiram sobre as células hematopoiéticas. Com a finalidade de evitar vícios de contagem sobre os campos comuns em um mesmo corte, foi feita a leitura sempre num mesmo sentido, ou seja, da esquerda para direita. Em cada lâmina foram contados cinco campos aleatórios, perfazendo um total de 500 pontos por lâmina.

No timo foram utilizadas cinco lâminas/grupo/dia de nascido e mensurados 10 (dez) lóbulos tímicos para determinação da área tímica, área da cortical e área da medular (Maurer et al., 1990; Alves et al., 2006). Todas as medidas foram efetuadas mediante o sistema analisador de imagens, Image Pro-plus, acoplado a um microscópio binocular da Olympus.

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3. Resultados

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão sumarizadas as médias e desvio-padrão do número total de hemácias, número total de leucócitos, hematócrito e contagem diferencial dos leucócitos nos períodos de 7, 14 e 21 dias de gestação, respectivamente. Só foram verificadas diferenças significativas aos 21 dias de gestação, representadas por uma redução no número total de leucócitos, do percentual do hematócrito, na percentagem de linfócitos, e um aumento nos percentuais de neutrófilos e eosinófilos nas ratas submetidas à pinealectomia e tratadas com placebo. Na tabela 4 estão expressos esses mesmos parâmetros para os filhotes com 10 dias após nascimento. Não foram verificadas diferenças significativas para os parâmetros analisados.

A análise histológica mostrou que o baço dos filhotes com 1 dia de nascido de todos os grupos experimentais, apresentaram parênquima constituído apenas pela polpa vermelha contendo cordões esplênicos ou de Billroth e, entre esses, capilares sinusóides, seios esplênicos e células hematopoiéticas (Figs. 1A e 1B). A partir do 5º dia de nascimento observou-se a formação da polpa branca caracterizada por nódulos linfáticos ou corpúsculos esplênicos esféricos com arteríola central (Figs 1C e 1D). Entretanto, no grupo em que as matrizes foram submetidas à pinealectomia e tratadas com placebo os corpúsculos esplênicos apresentaram forma irregular em comparação aos outros grupos experimentais (Figs. 1E e 1F). Morfometricamente, o baço dos filhotes desse grupo apresentou redução significativa do número de células hematopoiéticas com um e cinco dias de nascido (Tabelas 5 e 6), e na área, diâmetro máximo e mínimo dos corpúsculos esplênicos apenas com cinco dias de nascidos (Tabelas 6 e 7).

O timo dos filhotes com 1 dia, nascidos de ratas pinealectomizadas e tratadas com placebo apresentou-se menos desenvolvido, quando comparado aos outros grupos experimentais, com poucas lobulações contendo zonas cortical e medular, e espesso revestimento de tecido mesenquimal (Figs. 2A, 2B e 2C). Essas características mantiveram-se até o quinto dia de nascimento (Figs. 2D, 2E e 2F). Aos dez dias após nascimento os timos apresentaram características histológicas similares, porém foi observada a formação do corpúsculo de Hassal nos animais do grupo III (Figs. 3A e 3B). A análise morfométrica mostrou redução significativa na área tímica, cortical e medular apenas nos filhotes do grupo III com 1 e 5 dias de nascidos (Tabelas 5, 6 e 7).

A análise histoquímica não revelou alterações no estroma do baço e timo referente aos parâmetros: fibras colágenas, elásticas e reticulares (Tabela 8). Em todos os grupos experimentais os esfregaços sanguíneos corados com o Sudan Black apresentaram reação positiva para mieloperoxidase apenas para os neutrófilos, eosinófilos e monócitos (Figs. 3C - F).

4. Discussão

A redução do percentual do hematócrito nas fêmeas com 21 dias de gestação do grupo pinealectomizado tratado com placebo foi um reflexo da diminuição do número total de leucócitos, caracterizado pelo baixo percentual de linfócitos, embora tenha sido verificado neutrofilia e eosinofilia. Isto sugere que a melatonina pode ter ação modulatória diferente para esses tipos de leucócitos. Dentre as funções que a melatonina desempenha no sistema imune, a habilidade de inibir a apoptose é considerada o seu maior mecanismo (Paternoster et al., 2009). Estudos mostraram que linfócitos T e B são induzidos ao processo apoptótico em decorrência do estresse oxidativo, o qual aumenta com a aproximação do parto e é agravado pela pinealectomia, porém pode ser revertido pela administração de melatonina, indicando a importância desse hormônio para a integridade dos linfócitos (Sainz et al. 2000; Nakamura et. al., 2001; Fait et al., 2002; Pedrosa, 2006; Lialiaris et al., 2008; Tamura et. al., 2008; Paternoster et al., 2009). De forma diferente, a melatonina tem sido relacionada com a redução de neutrófilos em recém-nascidos (Gitto et al., 2001) e na apoptose dessas células em algumas patologias (Chen et al., 2003/05). No entanto, a melatonina tem mostrado induzir a eosinofilia por potencializar a ação da interleucina -2 (IL2) (Silva et al., 2004; Lissoni et al., 1993; Williamson et al., 1998) e no controle da liberação da peroxidase pelos eosinófilos durante a fagocitose (Lu et al., 2008). Nosso estudo mostrou eosinofilia na ausência da melatonina, o que pode estar relacionado aos elevados níveis de estrógeno observados em ratas após pinealectomia (Soares et al., 2003; Oztekin et al., 2006), uma vez que os eosinófilos são estimulados por esse esteróide (Lee et al., 1989; Ramos et al., 2000). A reação positiva para mieloperoxidase apenas para os neutrófilos, eosinófilos e monócitos está dentro da normalidade, pois quando não há reação nessas células caracteriza-se estados pré-leucêmicos,

enquanto que reações positivas nos linfócitos determinam a reticuloendoteliose leucêmica (Silva et al., 2006).

Os aspectos morfológicos e morfométricos observados no baço dos filhotes das fêmeas pinealectomizadas e tratadas com placebo foram bastante expressivas para os corpúsculos esplênicos e células hematopoiéticas não alterando, no entanto, o seu estroma. A presença de corpúsculos esplênicos com forma irregular e redução diâmetro máximo e mínimo indica que a ausência da melatonina materna pode ter levado a uma diminuição do número de células desse órgão e conseqüentemente uma desorganização do seu parênquima, pois quando animais submetidos à iluminação constante (pinealectomia artificial) ou que receberam injeções de bloqueadores para inibir a síntese de melatonina apresentaram uma diminuição do peso e da celularidade do baço, o que pode ser revertido pela reposição desse hormônio (Maestroni, 1993; Drazen et al., 2001; Rai et al., 2009). A presença das células hematopoiéticas no baço revela sua capacidade mielopoiética, ou seja, a propriedade de gerar os glóbulos vermelhos, que tende diminuir e tornar-se inativa no decurso da idade do animal (Slayton et al., 2002; Pacheco et al., 2003), porém a pinealectomia parece acelerar esse processo.

O menor desenvolvimento do timo dos filhotes com um e cinco dias de nascidos das fêmeas do grupo pinealectomizado e tratado com placebo, foi confirmado pelas análises morfométricas. Estudos mostraram atrofia do timo com diminuição do peso em ratos machos adultos, além ausência de distinção entre as zonas cortical e medular, bem como a perda de elementos linfóides após a pinealectomia (Öner et. al., 2004). Nossos achados apontam para a importância da melatonina no desenvolvimento e manutenção do timo em ratos neonatos, pois mesmo não havendo alterações morfométricas no timo dos filhotes com dez dias de nascidos, a presença do corpúsculo de Hassal indica um processo de maturação tímica precoce pelo fato dessa estrutura estar envolvida na atividade regulatória dos linfócitos T (Berthelot et al., 2010).

Nosso estudo mostrou que a ausência da melatonina materna além de interferir no hemograma materno, produz alterações morfológicas e morfométricas no timo e baço da prole nos cinco primeiros dias de vida, não tendo nenhuma influência aos dez dias de idade, o que pode estar relacionado ao fato de que em ratos a síntese de melatonina tem início entre o quinto e sétimo dia de vida quando é estabelecida a inervação da pineal (Pfeffer e Stehle, 1998).

5. Conclusão

A melatonina tem importante função na regulação do hemograma em ratas na última semana de gestação, e que a transferência materna desse hormônio para a prole durante a gestação é de grande importância para garantir o desenvolvimento normal do baço e timo nos primeiros dias de vida.

5. Referências

- ALVES, C.M.; VASCONCELOS, A.C., MARTINS, A.S., DEL PUERTO, H.L., SANTOS, F.G.A., NUNES, J.E.S.; CAMPOS, P.P., MORO, L.. Morphometric analysis of the thymus of puppies infected with the Snyder Hill Strain of canine distemper virus. **Arq. Bras. Med Vet. Zootec.**, v.58, n.4, p.472 - 479, 2006.
- BALEY, J.E.; SCHACTER, B.Z. Mechanisms of diminished natural killer cell activity in pregnant women and neonates. **J. Immunol.**, v.134, p.3042 – 3048, 1985.
- BERTHELOT, J.M.; GOFF, B.; MAUGARS, Y. Thymic Hassall's corpuscle, Regulatory T-Cells, and Rheumatoid Arthritis. **Semin. Arthritis Rheu.**, v.39, n.5, p.347 – 355, 2010.
- BISHNUPURI K.S.; HALDAR C. Impact of photoperiodic exposures during late gestation and lactation periods on the pineal and reproductive physiology of the Indian palm squirrel, *Funambulus pennanti*. **J. Reprod. Fétil.**, v.118, n.2. p.295 - 301, 2000.
- BISHNUPURI, K.S.; HALDAR, C. Maternal transfer of melatonin alters the growth and sexual maturation of young Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. **Biol. Signals Recept.**, v.10, n.5, p.317 - 325, 2001.
- CHEN, J-C.; NG, C-H.; CHIU, T-F.; CHEN, H-M. Altered neutrophil apoptosis activity is reversed by melatonin in liver ischemia-reperfusion. **J. Pineal Res.**, v.34, p.260 – 264, 2003.
- CHEN, H-M.; HSU, J-T.; CHEN, J-C.; NG, C-J.; CHIU, D-F.; CHEN, M-F. Delayed Neutrophil Apoptosis Attenuated by Melatonin in Human Acute Pancreatitis. **Pancreas.**, v.31, n.4, p.360 – 364, 2005.
- CLAUSTRAT, T.B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med. Rev.**, v.9, n.1, p.11 - 24, 2005.

DRAZEN, D.L.; BILU, D.; BILBO, S.D.; NELSON, R.J. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. **Am. J. Physiol – Reg. I.**, v.280, p.1476 – 82, 2001.

EL-SOKKARY, G.H.; REITER, R.J.; ABDEL-GHAFFAR, S.K.H. Melatonin supplementation restores cellular proliferation and DNA synthesis in the splenic and thimic lymphocytes of old rats. **Neuroendocrinol. Lett.**, v.24, n.4, p. 215 – 223, 2003.

ESQUIFINO, A.I.; CHACON, F.; CANO, P.; MARCOS, A.; CUTRERA, R.A.; CARDINALI, P. Twenty-four-hour rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and amino acid content in submaxillary lymph nodes of growing male rats subjected to calorie restriction. **J. Neuroimmunol.**, v.156, n.1, p.66 – 73, 2004.

FAAS, M.M.; BOUMAN, A.; NIEUWENHOVEN, A.L.V.V.; SCHAAF, G.V.D.; MOES, H.; HEINEMAN, M.J.; VOS, P. Species differences in the effect of pregnancy on lymphocyte cytokine production between human and rat. **J. Leukocyte Biol.**, v.78, p.946 – 953, 2005.

FAAS, M.M.; SCHUILING, G.A.; LINTON, E.A.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W.G. Activation of peripheral leukocytes in rat pregnancy and experimental pre-eclampsia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.182, p.351 – 357, 2000.

FAIT, V.; SELA, S.; OPHIR, E.; KHOURY, S.; NISSIMOV, J.; TKACH, M.; KHOTABA, S.; TARASOVA, L.; OETTINGER, M. Hyperemesis gravidarum is associated with oxidative stress. **Am. J. Perinat.**, v.19, n.2, p.93 – 98, 2002.

FLUTTERT, M.; DALM, S.; OITZL, M.S. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. **Lab. Anim.**, v.34, p.372 - 378, 2000.

GABRILOVAC, J.; ZADJELOVIC, J.; OSMAC, M.; SUCHANEK, E.; ZUPANOVIC, Z.; BORANIC, M. NK cell activity and estrogen hormone levels during normal human pregnancy. **Gynecol. Obstet. Inves.**, v.25, p.165 – 172, 1988.

GARCIA-MAURINO, S.; POZO, D.; CALVO, J.R.; GUERRERO, J.M. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. **J. Pineal Res.**, v.29, p.129 – 137, 2000.

GITTO, E.; KARBOWNIK, M.; REITER, J.R.; TAN, D.X.; CUZZOCREA, S.; CHIURAZZI, P.; CORDARO, S.P.; CORONA, G.; TRIMACHI, G.; BARBERI, I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. **Pediat. Res.**, v.50, p.756 - 760, 2001.

GOLALIPOUR, M.J.; KORD, H.; GHAFARI, S.; GHARRAVI, A.M.; DAVARIAN, A.; FAZELIL, S.A. AZARHOUSH, R. Morphometric alterations to the rat spleen following formaldehyde exposure. **Folia Morphol.**, v.67, n.1, p.66 – 71, 2008.

GOLDMAN, B.D. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. **Science's STKE.**, v.192, p.29 - 31, 2003.

GOMES, K. R.; SANTOS, M. G. C.; FRANCO, D. F.; PIRES, R. B.; SILVA, M. G.; NEVES, M. F.; BASSANI-SILVA, S. Avaliação do hematócrito e da proteína plasmática em sangues hemodiluídos. **REV. CIENT. ELETR. MED. VET.**, n. 07, p. 1-5, 2006.

KLEIN, D.C. Evidence for the placental transfer of 3 H-acetyl-melatonin. **Nature.**, v. 237, n.73, p.117 – 118, 1972.

KUSZAK, J.; RODIN, M. A new technique of pinealectomy for adult rats. **Experientia.**, v.33, p.283 - 284, 1977.

LACERDA, A.F.S.; JANJOPPI, L.; SCORZA, F.A.; LIMA, E.; AMADO, D.; CAVALHEIRO, E.A.; ARIDA, R. M. Physical exercise program reverts the effects of pinealectomy on the amygdale kindling development. **Brain Res. Bull.**, v.74, n.4, p.216 - 220, 2007.

LANG, C.H.; BAGBY, G.J.; HARGROVE, D.M.; HYDE, P.M.; SPITZER, J.J. Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia. **Am. J. Physiol – Endoc. M.**, v.253, p.E657 - E663, 1987.

LEE, Y.H.; HOWE, R.S.; SHA, S.J.; TEUSCHER, C.; SHEEHAN, D.M.; LYTTLE, C.R. Estrogen regulation of an eosinophil chemotactic factor in the immature rat uterus. **Endocrinology**, v.125, p.3022 – 3028, 1989.

LIALIARIS, T.; LYRATZOPOULOS, E.; PAPACHRISTOU, F.; SIMOPOULOU, M.; MOURELATOS, C.; NIKOLETTOS, N. Supplementation of melatonin protects human lymphocytes in vitro from the genotoxic activity of melphalan. **Mutagenesis**, v.23, n.5, p.347 – 354, 2008.

LIMA, E.; SOARES- JR, J.M.; GARRIDO, Y.C.S.; VALENTE, S.G.; PRIEL, M.R.; BARACAT, E.C.; CAVALHEIRO, E.A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; AMADO, D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. **Brain Res.**, v.1043, n.1/2, p.24 - 31, 2005.

LISSONI, P.; ARDIZZOIA, A.; TISI, E.; ROSSINI, F.; BARNI, S.; TANCINI, G.; CONTI, A.; MAESTRONI, G.J. Amplification of eosinophilia by melatonin during the immunotherapy of cancer with interleukin-2. **J. Biol. Reg. Homeos. Ag.**, v.7, n.1, p.34 – 36, 1993.

LU, T.; GALIJASEVIC, S.; ABDULHAMID, I.; ABU-SOUD, H.M. Analysis of the mechanism by which melatonin inhibits human eosinophil peroxidase. **Brit. J. Pharmacol.**, v.154, n.6, p.1308 – 1317, 2008.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front Neuroendocrinol.**, v.25, n.3/4, p.177 - 195, 2004.

MAESTRONI, G.J.M. MLT and the immune-hematopoietic system. **Adv. Exp. Med Biol.**, v.460, p.395 - 405, 2002.

MAESTRONI, G.J.M. The immunoendocrine role of melatonin, **J. Pineal Res.**, v.14, p.1 – 10, 1993.

MAESTRONI, G.J.; CONTI, A.; LISSONI, P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. **Cancer Res.**, v.54, p.4740 – 4743, 1994.

MAESTRONI, G.J.; COVACCI, V.; CONTI, A. Hematopoietic rescue via Tcell dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. **Cancer Res.**, v.54, p.2429 – 2432, 1994.

MARKERT, U.R.; FITZGERALD, J.S.; SEYFARTH, L.; HEINZELMANN, J.; VAROSI, F.; VOIGT, S.; SCHLEUSSNER, E.; SEEWALD, H.J. Lessons from reproductive immunology for other fields of immunology and clinical approaches. **Chem. Immunol. Allergy.**, v.89, p.169 – 179, 2005.

MARTINS, E.J.; FERNANDES, L.C.; BARTOL, I.; CIPOLLA-NETO, J.; COSTA ROSA, L.F. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumor-bearing rats. **J. Neuroimmunol.**, v.82, n.1, p.81 – 89, 1998.

MAURER, J.K.; GIBBONASN, B.A.; BRUCE, D.R. Morphometric assessment of thymic size variation in laboratory rabbits. **Toxicol. Patholog.**, v.18, n.3, p.407 – 411, 1990.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; KASHIDA, S.; TAKAYAMA, H.; YAMAGATA, Y.; KARUBE, A.; SUGINO, N.; KATO, H. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. **J. Pineal Res.**, v.30, n.1, p.29 - 33, 2001.

ÖNER, H.; KUS, I.; ÖNER, J.; ÖGETÜRK, M.; OZAN, E.; AYAR, A. Possible effects of melatonin on thymus gland after pinealectomy in rats. **Neuroendocrinol. Lett.**, v.25, n.1/2, p.115 – 118, 2004.

OZTEKIN, E.; MOGULKOC, R.; BALTACI, A.K.; TIFTIK, A.M. The influence of estradiol and progesterone and melatonin supplementation on TNF-alpha levels in ovariectomized and pinealectomized rats. **Acta Biol. Hung.**, v.57, n.3, p.275 - 81, 2006.

PACHECO, M.R.; NAKAGHI, L.S.O.; ARTONI, S.M.B.; GANECO, L.N.; CARVALHO, A.C. F. Morfologia da megacariocitopoiese esplênica em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, no final da gestação e pos-natal. **Acta Sci.**, v.25, n.1, p.109-114, 2003.

PATERNOSTER, L.; RADOGNA, F.; ACCORSI, A.; ALBERTINI, M.C.; GUALANDI, G.; GHIBELLI, L. Melatonin as a Modulator of Apoptosis in B-Lymphoma Cells. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1171, p.345 – 349, 2009.

PEDROSA, A.M.C. **Triptofano, melatonina e seus produtos de oxidação: ações sobre os linfócitos T**. 2006. Dissertação (tese de doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PENICAUD, L.; FERRE, P.; KANDE, J.; LETURQUE, A.; ISSAD, T.; GIRARD, J. Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. **Am. J. Physiol. – Endocrinol. M.**, v.252, p.E365 - E369, 1987.

PEREIRA, S.A.L.; RODRIGUES, D.B.R.; CASTRO, E.C.C.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. Morphometric study of the spleen in chronic chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.66, n.4, p.401 - 403, 2002.

PERTSOV, S. Effect of melatonin on the thymus, adrenal glands, and spleen in rats during acute stress. **B. Exp. Biol. Med+.**, v.141, n.3, p.292 - 295, 2006.

PFEFFER, M.; STEHLE J.H. Ontogeny of a diurnal rhythm in arylalkylamine-N-acetyltransferase mRNA in rat pineal gland. **Neurosci. Lett.**, v. 248, p.163 – 166, 1998.

RAI, S.; HALDAR, C.; SINGH, R. Modulation of immunity in young-adult and aged squirrel, *Funambulus pennati* by melatonin and p-chlorophenylalanine. **I. & A.**, v.6, n.5, p.1 – 8, 2009.

RAMOS, J.G.; VARAYOUD, J.; KASS, L.; RODRIGUEZ, H.; MUÑOZ DE TORO, M.; MONTES, G.S.; LUQUE, E.H. Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. **Steroids.**, v.65, p.409 – 414, 2000.

REPPERT, S.M.; CHEZ, R.A.; ANDERSON, A.; KLEIN, D.C. Maternal– fetal transfer of melatonin in the non-human primate. **Pediatr. Res.**, v.13, p.788 – 791, 1979.

SAINZ, R.M.; REITER, R.J.; MAYO, J.C.; CABRERA, J.; TAN, D-X.; QI, W.; GARCIA, J.J. Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effects of pinealectomy. **J. Reprod. Fertil.**, v.119, p.143 – 149, 2000.

SANTELLO, F. H. **Efeito da administração de melatonina oral na evolução da doença de chagas experimental em ratos wistar infectados com a cepa Y de *Trypanossoma cruzi*.** 2005. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SARGENT, I.L.; BORZYCHOWSKI, A.M.; REDMAN, C.W. NK cells and human pregnancy—an inflammatory view. **Trends Immunol.**, v.27, p.399 – 404, 2006.

SHAKHAR, K.; VALDIMARSDOTTIR, H.B.; HEIGHTENED, D.H.B. Risk of Breast Cancer Following Pregnancy: Could Lasting Systemic Immune Alterations Contribute? **Cancer Epidem. Biomar.**, v.16, n.6, p.1082 – 1086, 2007.

SILVA, A.S.; DOYLE, R.L.; MONTEIRO, S.G. Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. **Revista da FZVA.**, v.13, n.2, p.153 - 157, 2006.

SILVA, G.C.; PILGER, D.A.; CASTRO, S.M.; WAGNER, S.C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.42, n.2, p.77 – 84, 2006.

SILVA, S.O.; RODRIGUESA, M.R.; XIMENESA, V.F.; BUENO-DA-SILVAB, A.E.B.; AMARANTE-MENDES, G.P.; CAMPA, A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **J. Neuroimmunol.** v.156, p.146–152, 2004.

SLAYTON, W.B.; GEORGELAS, A.L.; PIERCE, J.; ELENITOBA-JOHNSON, K.S.; PERRY, S.S.; MARX, M.; SPANGRUDE, G.J. The spleen is a major site of megakaryopoiesis

following transplantation of murine hematopoietic stem cells. **A. S. H.**, v.100, n.12, p.3975 – 3982, 2002.

SOARES JR, J. M.; SIMÕES, M.J.; OSHIMA, C.T.; MORA, O.A.; DE LIMA, G.R.; BARACAT, E.C. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cel morphology and decreases progesterone receptor expression. **Gynecol. Endocrinol.**, v.17, n.2, p.115 – 123, 2003.

SOMERSET, D.A.; ZHENG, Y.; KILBY, M.D.; SANSOM, D.M.; DRAYSON, M.T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. **Immunology.**, v.112, p.38 – 43, 2004.

SUBRAMANIAN, P.; MIRUNALINI, S.; PANDI-PERUMAL, S.R.; TRAKHT, I.; CARDINALI, D.P. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.571, p.116 – 119, 2007.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TERRON, M.P.; FLORES, L.J.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D-X; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and pregnancy in the human. **Reprod. Toxicol.**, v.25, p.291 – 303, 2008.

VALLADA E.P. **Manual de Técnicas Hematológicas**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. 423p.

VEENSTRA VAN NIEUWENHOVEN, A.L.; HEINEMAN, M.J.; FAAS, M.M. The immunology of successful pregnancy. **Hum. Reprod. Update.**, v.9, p.347 – 357, 2003.

WEAVER, D.R.; NAMBOODIRI, M.A.A.; REPPERT, S.M. Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. **FEBS Lett.**, v.228, p.105 – 109, 1988.

WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **J. Cell Biol.**, v.30, p.23 – 38, 1966.

WILLIAMSON, B.L.; TOMLINSON, A.J.; MISHRA, P.K.; GLEICH, G.J.; NAYLOR, S. Related Compounds from L-Tryptophan Associated with Eosinophilia-Myalgia Syndrome. **Chem. Res. Toxicol.**, v.11, n.3, p.234 – 240, 1998.

WRONKA, M.; MALESZEWSKA, M.; STĘPIŃSKA, U.; MARKOWSKA, M. Diurnal differences in melatonin effect on intracellular Ca^{2+} concentration in chicken spleen leukocytes in vitro **J. Pineal Res.**, v.44, n.2, p.134 – 140, 2008.

YELLON, S.M.; LONGO, L.D. Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy. **Biol. Reprod.**, v.39, p.1093 – 1099, 1988.

Tabela 1. ¹Médias do hematócrito e contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 7 dias de gestação.

Grupos	I	II	III	IV	P
Hemácias (x10⁶ µL)	9,2 ± 0,6	9,2 ± 1,1	8,8 ± 0,8	9,9 ± 0,6	0,2046
Leucócitos (x10³ µL)	9,9 ± 2,4	9,1 ± 2,4	9,0 ± 1,6	9,9 ± 1,2	0,8137
Hematócrito (%)	46,25 ± 3,94	49,41 ± 5,74	48,83 ± 1,57	51,16 ± 1,77	0,3224
Linfócitos (%)	67,91 ± 2,12	66,00 ± 1,14	66,50 ± 3,98	66,91 ± 3,50	0,7885
Neutrófilos (%)	23,50 ± 1,77	22,41 ± 1,02	20,33 ± 1,62	21,58 ± 1,66	0,3688
Eosinófilos (%)	6,00 ± 0,43	5,96 ± 0,30	7,41 ± 1,04	6,16 ± 0,38	0,2272
Monócitos (%)	1,66 ± 0,28	1,91 ± 0,58	0,83 ± 0,52	1,33 ± 0,38	0,2163
Basófilos (%)	0,66 ± 0,28	0,41 ± 0,38	0,16 ± 0,14	0,25 ± 0,16	0,2074

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 2. ¹Médias do hematócrito e contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 14 dias de gestação.

Grupos	I	II	III	IV	P
Hemácias x(10⁶ µL)	9,5 ± 0,5	9,4 ± 0,7	10,4 ± 0,8	9,9 ± 0,7	0,3653
Leucócitos (x10³ µL)	8,8 ± 1,5	8,8 ± 2,1	8,3 ± 2,2	9,2 ± 1,5	0,9074
Hematócrito (%)	48,08 ± 4,16	44,98 ± 2,32	43,49 ± 2,57	44,24 ± 3,21	0,2616
Linfócitos (%)	69,58 ± 2,44	65,41 ± 1,99	67,91 ± 2,06	66,16 ± 2,32	0,5683
Neutrófilos (%)	20,83 ± 2,12	24,41 ± 2,45	23,50 ± 2,41	23,08 ± 1,81	0,5953
Eosinófilos (%)	4,75 ± 0,90	5,00 ± 0,25	6,08 ± 0,88	4,91 ± 0,87	0,1372
Monócitos (%)	1,91 ± 0,14	2,16 ± 0,28	1,33 ± 0,52	2,33 ± 0,62	0,0681
Basófilos (%)	0,50 ± 0,25	0,43 ± 0,32	0,26 ± 0,14	0,75 ± 0,56	0,4582

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 3. ¹Médias do hematócrito e contagem total e diferencial das células sanguíneas das ratas com 21 dias de gestação.

Grupos	I	II	III	IV	P
Hemácias (x10⁶ µL)	8,5 ± 0,5	8,4 ± 0,7	8,5 ± 0,9	8,5 ± 0,8	0,6082
Leucócitos (x10³ µL)	16,1 ± 0,9a	16,7 ± 0,7a	7,3 ± 0,7b	17,9 ± 0,6a	0,0160
Hematócrito (%)	44,24 ± 4,78a	43,66 ± 4,06a	34,58 ± 2,11b	45,33 ± 3,81a	0,0364
Linfócitos (%)	69,25 ± 0,43a	67,33 ± 1,37a	37,16 ± 1,14b	68,00 ± 1,28a	0,0021
Neutrófilos (%)	20,00 ± 1,25a	21,50 ± 0,90a	28,58 ± 1,50b	22,08 ± 1,73a	0,0028
Eosinófilos (%)	6,25 ± 0,50a	6,00 ± 0,27a	8,33 ± 0,62b	6,16 ± 1,01a	0,0074
Monócitos (%)	2,33 ± 0,52	2,75 ± 0,25	1,83 ± 0,76	2,16 ± 0,38	0,2557
Basófilos (%)	0,58 ± 0,38	0,33 ± 1,44	0,41 ± 0,52	0,35 ± 0,25	0,7013

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 4. ¹Médias do hematócrito e contagem total e diferencial das células sanguíneas dos filhotes com 10 dias de nascidos.

Grupos	I	II	III	IV	P
Hemácias (x10⁶ µL)	4,2 ± 0,3	4,2 ± 0,5	3,8 ± 0,4	4,3 ± 0,3	0,8620
Leucócitos (x10³ µL)	2,8 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,2	0,4554
Hematócrito (%)	35,88 ± 2,58	34,86 ± 3,56	34,33 ± 0,88	35,11 ± 2,83	0,9091
Linfócitos (%)	73,13 ± 3,10	74,96 ± 3,35	73,90 ± 2,57	77,96 ± 2,32	0,3806
Neutrófilos (%)	15,38 ± 2,05	16,93 ± 3,95	18,10 ± 3,14	16,56 ± 2,23	0,6762
Eosinófilos (%)	8,90 ± 1,58	7,66 ± 2,08	7,36 ± 0,57	8,33 ± 1,52	0,6359
Monócitos (%)	1,43 ± 0,80	1,23 ± 1,20	0,46 ± 0,40	1,00 ± 0,70	0,5475
Basófilos (%)	0,53 ± 0,20	0,37 ± 0,22	0,40 ± 0,36	0,26 ± 0,15	0,7358

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 5. ¹Médias dos parâmetros morfométricos do baço e timo dos filhotes com 1 dia de nascido.

Baço					
Grupos	I	II	III	IV	P
Área (μm^2)	*	*	*	*	-
Diâmetro Máximo (μm)	*	*	*	*	-
Diâmetro Mínimo (μm)	*	*	*	*	-
Células Hematopoiéticas	15,83 $\pm$ 2,12a	14,33 $\pm$ 3,95a	9,66 $\pm$ 1,52b	17,23 $\pm$ 1,50a	0,0262
Timo					
Grupos	I	II	III	IV	P
Área Tímica (μm^2)	1342,57 $\pm$ 234,76a	1567,89 $\pm$ 326,09a	906,41 $\pm$ 240,28b	1467,43 $\pm$ 249,81a	0,0398
Área Cortical (μm^2)	576,88 $\pm$ 76,44a	498,05 $\pm$ 65,90a	278,72 $\pm$ 56,91b	550,06 $\pm$ 59,44a	0,0196
Área Medular (μm^2)	255,90 $\pm$ 66,41a	203,87 $\pm$ 50,77a	114,65 $\pm$ 31,09b	243,55 $\pm$ 49,12a	0,0056

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

* Não apresentaram corpúsculos esplênicos.

Tabela 6. ¹Médias dos parâmetros morfométricos do baço e timo dos filhotes com 5 dias de nascidos.

Baço					
Grupos	I	II	III	IV	P
Área (μm^2)	178,22 $\pm$ 22,89a	169,61 $\pm$ 19,55a	239,83 $\pm$ 15,03b	173,66 $\pm$ 16,39	0,0249
Diâmetro Máximo (μm)	67,88 $\pm$ 9,02a	63,00 $\pm$ 11,98a	98,76 $\pm$ 10,08b	59,49 $\pm$ 8,73a	0,0187
Diâmetro Mínimo (μm)	63,15 $\pm$ 10,76a	60,66 $\pm$ 7,21a	35,39 $\pm$ 9,87b	57,63 $\pm$ 7,05a	0,0492
Células Hematopoiéticas	10,50 $\pm$ 1,50a	11,83 $\pm$ 0,95a	7,66 $\pm$ 1,43b	13,05 $\pm$ 2,50a	0,0166
Timo					
Grupos	I	II	III	IV	P
Área Tímica (μm^2)	3765,52 $\pm$ 167,00a	3546,88 $\pm$ 149,37a	2976,31 $\pm$ 112,63b	3497,98 $\pm$ 166,05a	0,0022
Área Cortical (μm^2)	1974,55 $\pm$ 114,04a	1754,41 $\pm$ 125,73a	866,02 $\pm$ 155,99b	1798,40 $\pm$ 119,88a	0,0153
Área Medular (μm^2)	564,99 $\pm$ 53,61a	509,76 $\pm$ 49,83a	332,89 $\pm$ 50,11b	588,27 $\pm$ 47,43a	0,0066

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 7. ¹Médias dos parâmetros morfométricos do baço e timo dos filhotes com 10 dias de nascidos.

Baço					
Grupos	I	II	III	IV	P
Área (μm^2)	322,78 $\pm$ 29,06	309,77 $\pm$ 25,91	299,35 $\pm$ 22,07	313,17 $\pm$ 31,54	0,4732
Diâmetro Máximo (μm)	87,55 $\pm$ 10,02	76,39 $\pm$ 9,77	88,45 $\pm$ 11,02	89,66 $\pm$ 8,98	0,2807
Diâmetro Mínimo (μm)	85,15 $\pm$ 7,60	73,21 $\pm$ 6,98	84,07 $\pm$ 8,51	88,38 $\pm$ 9,81	0,1906
Células Hematopoiéticas	8,75 $\pm$ 2,71	10,65 $\pm$ 2,07	6,92 $\pm$ 2,86	9,22 $\pm$ 2,74	0,1001
Timo					
Grupos	I	II	III	IV	P
Área Tímica (μm^2)	5376,66 $\pm$ 144,00	5461,56 $\pm$ 137,49	5227,98 $\pm$ 163,12	5387,45 $\pm$ 165,70	0,1437
Área da Cortical (μm^2)	2474,31 $\pm$ 124,66	2375,51 $\pm$ 155,22	2298,76 $\pm$ 135,08	2543,80 $\pm$ 139,21	0,3428
Área Medular (μm^2)	755,65 $\pm$ 65,13	724,99 $\pm$ 51,01	698,58 $\pm$ 57,04	713,67 $\pm$ 62,80	0,2966

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

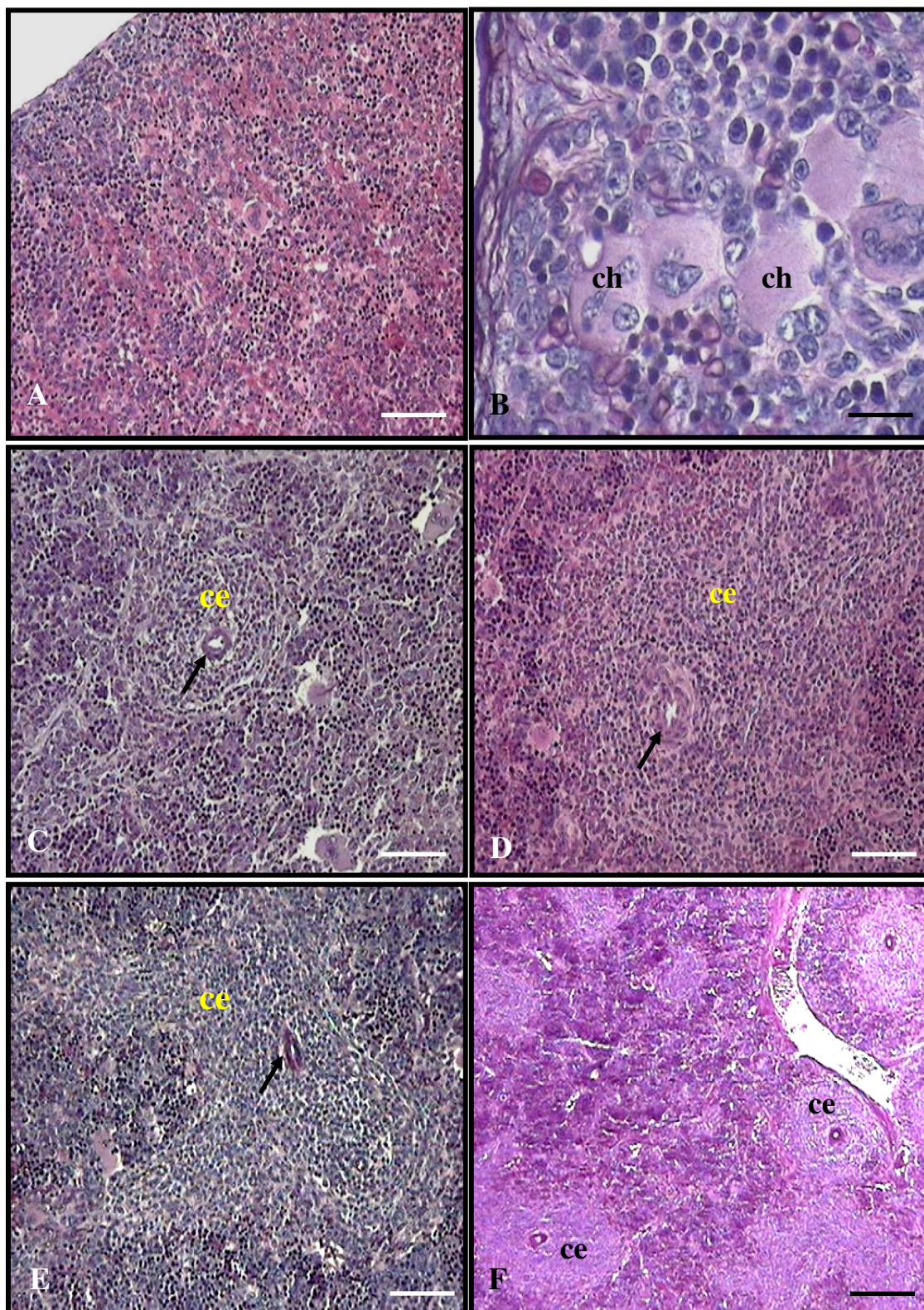


Figura 1: Baço dos filhotes. A- Vista geral do parênquima esplênico GI-1dia. H.E. Barra= 25μm. B- Células hematopoiéticas (ch) GII-5dias. H.E. Barra= 25μm. C, D, E e F -Corpúsculo esplênico (ce) com arteríola central (seta) aos 10 dias de nascimento nos grupos experimentais I, II, III e IV, respectivamente. H.E. Barra= 100 μm.

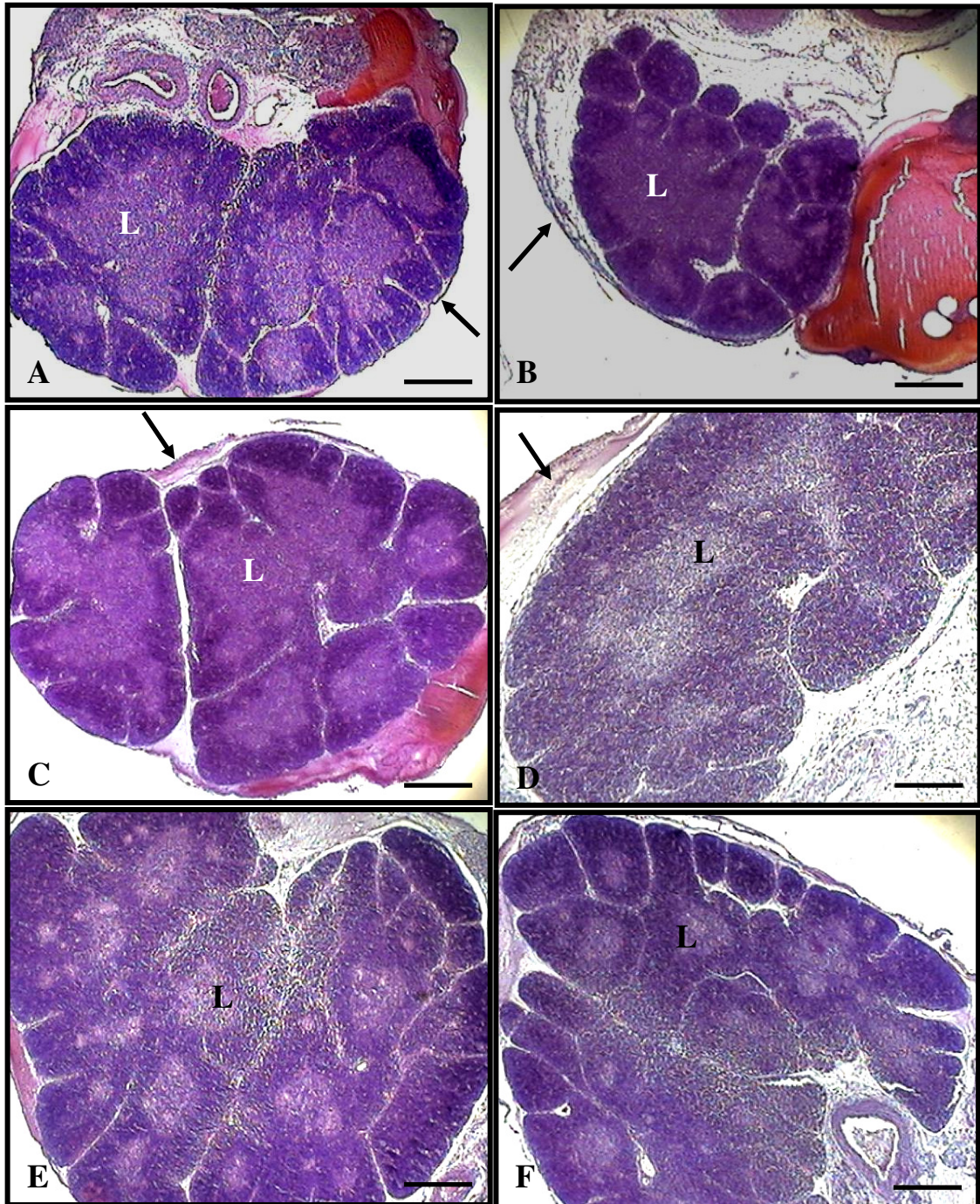


Figura 2: Timo dos filhotes. A, B e C – Lóbulos tímicos (L) em diferentes estágios de desenvolvimento com 1 dia de nascidos nos grupos experimentais I, III e IV, respectivamente. H.E. Barra= 100μm. D – lóbulo tímico com 5 dias de nascidos do grupo III mostrando-se ainda pouco desenvolvido em relação aos observados nos grupos II (E) e IV (F). H.E. Barra= 100μm.

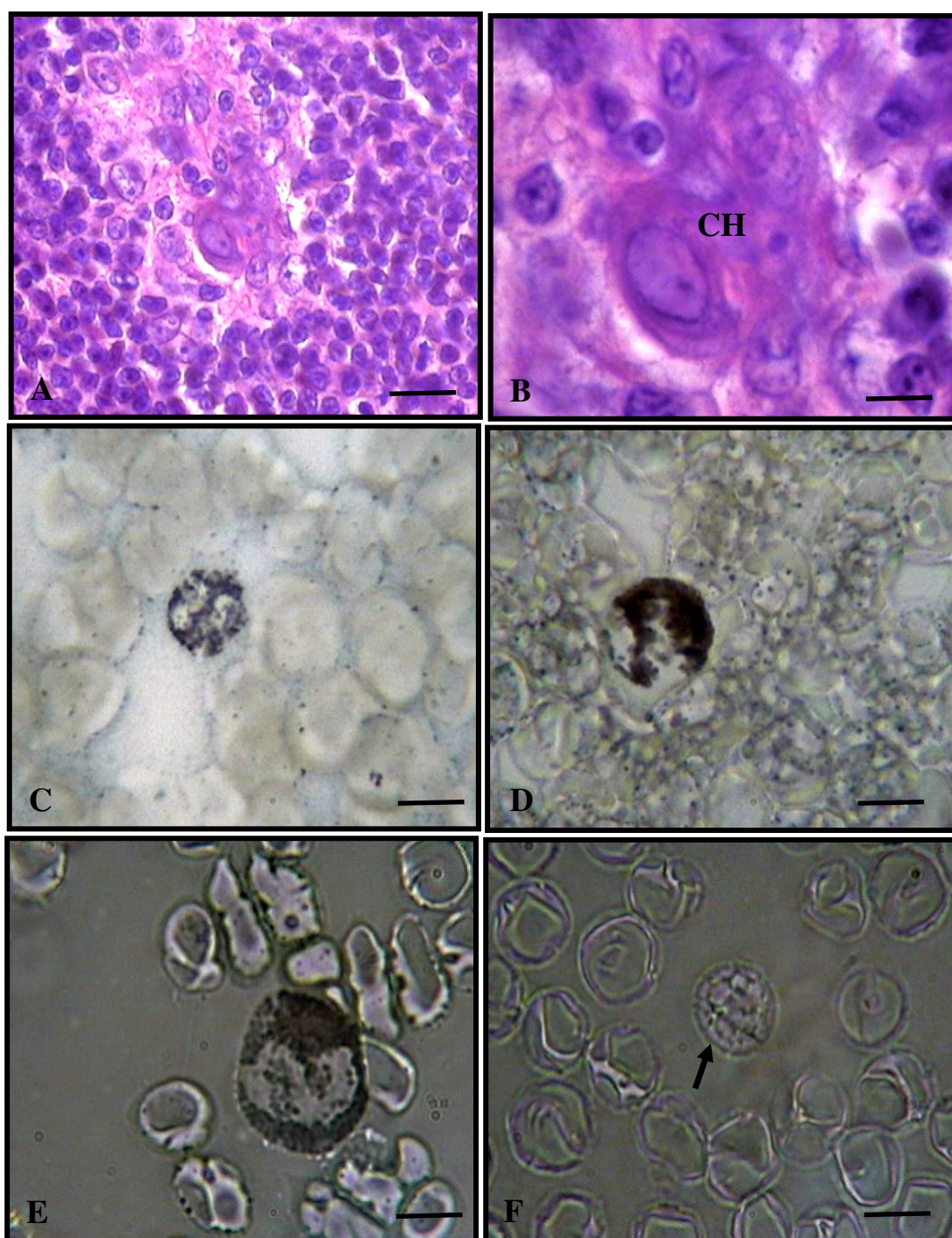


Figura 3: Timo dos filhotes com 10 dias de vida do G III. A – Vista geral do corpúsculo de Hassal. H. E. Barra = 25µm. B – Células reticuloepiteliais (setas) compondo o corpúsculo de Hassal. H. E. Barra = 100µm. Sangue materno corado pelo Sudam Black 1,4%. C – Neutrófilo, D – Eosinófilo, D – Monócito, e em F – Linfócito (seta). Barras = 100µm.

Tabela 1: Histoquímica do baço e timo dos filhotes dos grupos experimentais.

	GI		GII		GIII		GIV	
	Baço	Timo	Baço	Timo	Baço	Timo	Baço	Timo
Fibras colágenas	±	±	±	±	±	±	±	±
Fibras elásticas	+	+	+	+	+	+	+	+
Fibras reticulares	++	++	++	++	++	++	++	++
Reação intensa (++), moderada (±) e fraca (+)								