

Invest. Medicoquir 2020 (enero abril); 12 (1)

ISSN: 1995-9427, RNPS: 2162

**ARTÍCULO ORIGINAL**

***Evaluación morfométrica de los folículos esplénicos en ratas alcohólicas  
adolescentes inoculadas con vacuna Heberbiovac HB  
Splenic lymphoid nodules morphometric evaluation in alcoholic adolescents rats  
with Heberbiovac HB vaccine***

Jacqueline Malherbe Pérez<sup>1</sup>, Aleida Herrera Batista<sup>1</sup>, Héctor Juan Ruiz Candina<sup>1</sup>, Janet Cueto González.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Ciencias Médicas de la Habana ICBP "Victoria de Girón

**RESUMEN:**

**Introducción.** El alcoholismo es una enfermedad crónica incurable que en la actualidad se ha incrementado entre jóvenes y adolescentes, representando un grave problema de salud para la humanidad. El consumo excesivo de alcohol afecta a casi todo el organismo incluyendo al sistema inmune, constituyendo además una droga portero que favorece el consumo de otras drogas. **Métodos.** Se utilizaron 58 ratas adolescentes de 30 días de nacidas y del sexo masculino, las cuales fueron divididas en dos grupos: tratadas durante un mes y durante dos meses. Ambos grupos fueron a su vez divididos en tres subgrupos: experimental tratado con etanol y vacuna Heberbiovac-HB; un grupo control positivo tratado con agua y vacuna y un grupo control negativo al que se le suministró agua y solución salina en lugar de la vacuna. Al finalizar la experiencia los animales fueron sometidos a eutanasia obteniéndose cortes histológicos del bazo, que fueron coloreados con hematoxilina y eosina y estudiados mediante el sistema morfométrico MADIP. **Resultados.** Las áreas centrales y totales

de los folículos de las ratas experimentales fueron similares a los encontrados en las ratas controles negativas; sin embargo, presentaron volúmenes mayores que los mostrados por los folículos de las ratas controles positivos. **Conclusiones.** Es posible que en esta etapa del ciclo vital el etanol posea un efecto estimulante sobre este órgano.

**Palabras clave:** adolescencia, alcoholismo crónico, ratas, características morfométricas, bazo, folículos linfáticos.

## **ABSTRACT**

**Introduction.** Alcoholism is an incurable chronic disease that nowadays it has been increased between young people and adolescents, which turns it into one of the main medical-social problems facing mankind. Excessive alcohol consumption affects practically whole body includes immune system and it is a porter drug that allowed others drugs consumption. **Methods.** It had used 58 male adolescent 30 days old rats. They were treated during one or two months. Both groups were divided in three subgroups: the experimental group were treated with ethanol and Heberbiovac-HB vaccine; positive control were treated with water and Heberbiovac-HB vaccine and negative control group received water and saline solution instead of Heberbiovac-HB vaccine. It was used histological sections and Cuban MADIP morphometric system for the study. **Results.** Central and total areas of secondary lymphatic follicles of animals treated with ethanol and Heberbiovac-HB vaccine were similar to those parameters in negative control animal, and very larger volume than positive control animals and It was unexpected result. **Conclusions.** It possible at that vital period of life ethanol stimulates this organ.

**Key words:** Adolescence, chronic alcoholism, rats, morphometry, spleen, lymphatic follicles

## INTRODUCCIÓN

El alcoholismo es una enfermedad crónica incurable que afecta tanto a adultos como a jóvenes y adolescentes. En las últimas décadas se han realizado estudios que reflejan los daños causados por la ingestión incontrolada de etanol, tanto en el hombre como en animales de experimentación. Reportes actuales plantean un incremento en el número de consumidores, así como en la cantidad de alcohol consumido.<sup>1-5</sup> Así mismo, se estima que un elevado número de bebedores mueren cada año por causas relacionadas con el alcohol.<sup>6</sup>

La adolescencia es una etapa del desarrollo donde las conductas de riesgo son habituales y se van definiendo la mayor parte de las prácticas que determinan las opciones y los estilos de vida del individuo. Los adolescentes consumen alcohol como estrategia para afrontar el estrés propio de la vida académica y esto suelen hacerlo en grupo con sus pares y con el deseo de ser aceptado por estos.<sup>7</sup>

La mayoría de las investigaciones que analizan el alcoholismo durante la adolescencia, son de carácter epidemiológicos,<sup>8-10</sup> siendo insuficientes los trabajos experimentales en modelos biológicos que abordan los efectos de esta droga, en esta etapa del desarrollo, y que pudieran aportar datos para su mejor comprensión y tratamiento.

Se han realizado trabajos en condiciones experimentales con modelos animales para evaluar los efectos tóxicos del etanol sobre algunos órganos.<sup>11-13</sup> Sin embargo, estos no abordan los efectos sobre el bazo que juega un importante papel en la respuesta inmune, siendo un órgano efector de la misma. Determinar los efectos que este tóxico provoca sobre dicho órgano sería de incalculable valor para comprender el comportamiento de esta droga psicoactiva sobre el sistema inmune, en particular en la adolescencia.

En la literatura revisada se encontraron pocos datos que aborden el efecto del alcohol sobre los órganos del sistema inmune. Por tales razones el presente trabajo tuvo como objetivo determinar las variaciones que la ingestión crónica de etanol produce sobre las áreas centrales y totales de los folículos linfáticos del bazo en ratas adolescentes inoculadas con la vacuna Heberbiovac-HB.

## MÉTODOS

Se emplearon 58 ratas albinas machos de 30 días de nacidas. El experimento se diseñó para dos tiempos, un mes y dos meses de tratamiento y cada uno de los grupos se subdividió en tres subgrupos: uno experimental al que se le administró etanol mediante cánula intraesofágica y se inmunizó con la vacuna Heberbiovac-HB (EV) y dos controles, uno negativo al se le suministró agua y se le inoculó solución salina (ASS), esto último en lugar de la vacuna y otro subgrupo como control positivo al que se le administró agua y se inmunizó con la vacuna Heberbiovac-HB (AV). Se utilizó etanol al 40% diluido en agua, a razón de 3 gramos por kg de peso corporal, en una dosis única diaria, por vía oral con cánula intraesofágica.<sup>14</sup> A las ratas no tratadas con etanol se les administró agua empleando la misma dosis, horario y procedimiento. La vacuna se administró por vía intramuscular, en el cuádriceps derecho del animal a la dosis 0.1 ml.

**Tabla 1.** Esquema de inmunización

Esquema de Inmunización				
Días de nacido	30 días	37 días	51 días	65 días
Días de tratamiento	0	7	21	36
Dosis	1ra	2da	3ra	refuerzo

Al concluir el experimento los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico. Se extrajo el bazo, se tomaron fragmentos de cinco milímetros y se fijaron en formol al 12 % tamponado. Luego fueron deshidratados en alcoholes crecientes, aclarados con xilol y procesados por el método de la parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de cuatro micras con micrótopo vertical marca Spencer. Para el estudio morfométrico se digitalizaron las imágenes y se realizaron mediciones sobre ellas utilizando el sistema cubano MADIP.<sup>15</sup>

En todos los animales del experimento se estudiaron los folículos linfáticos secundarios seleccionados al azar, para lo cual se desenfocaba el microscopio se movía la lámina y se volvía a enfocar para continuar la medición en la nueva área seleccionada. Se analizaron las variables morfométricas; áreas centrales (AC) y áreas totales (AT) de los folículos. Para determinar cada una de ellas se tomó como referencia el seno marginal presente en estas estructuras. Las mediciones se realizaron contorneando manualmente, sobre imágenes digitalizadas con el objetivo 10x. Se midieron tres folículos por cada animal.

El análisis de los datos se realizó, a partir de los ficheros con los resultados de las mediciones que se exportaron a una tabla de Microsoft Excel y esta a su vez al paquete estadístico SPSS. Como primer procedimiento se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) para ver el efecto de las variables: grupo y tiempo sobre las variables del estudio. El MANOVA mostró el estadístico (la  $\lambda$  de Wilks con su correspondiente significación) para cada efecto grupo, tiempo, así como grupo tiempo y para las variables dependientes en su conjunto. Luego se realizó un ANOVA para cada una de las variables que arroja tres estadísticos (uno correspondiente a cada variable dependiente). Luego en el SPSS en el cual se realizaron las pruebas a posteriori, cuando el efecto grupo fue significativo, para ver cuáles eran los grupos que diferían entre sí. Se realizaron comparaciones binarias dos a dos entre los diferentes grupos para todas las variables del estudio.

### Consideraciones éticas

Los animales fueron tratados según normas el reglamento del Bienestar Animal de la institución. La aplicación del tratamiento y demás procederes contó con la debida esterilización de los materiales empleados y fue realizado por un personal adiestrado en la manipulación de los animales, donde se garantizó el menor sufrimiento para los mismos. La eutanasia está incluida en la definición de términos del reglamento.

## RESULTADOS

Al realizar el análisis comparativo de las áreas totales de los folículos en los diferentes grupos de animales de un mes se observó que las áreas de los tratados con etanol y vacuna fueron superiores a los tratados con agua y vacuna (control positivo) y similares al grupo tratado con agua y solución salina (control negativo) ( $p < 0.05$ ).

Las áreas centrales tuvieron un comportamiento diferente. Al realizar el análisis de las medias entre los tres grupos se comprobaron diferencias significativas entre los tres grupos ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el efecto tiempo solo mostró diferencias significativas para el área total.

Por otra parte, la interacción grupo/tiempo no mostró diferencias significativas para ninguna de las áreas. Como el efecto grupo resultó significativo en ambas variables, se analizó el mismo de forma independiente para cada tiempo mediante la  $\lambda$  de Wilks. Al aplicar este método se encontró que no hubo diferencias significativas al mes de tratamiento.

Por lo tanto, los valores significativos obtenidos fueron a expensas de los resultados a los dos meses de tratamiento. A su vez, al hacer este análisis en cada una de las áreas estudiadas se comprobó que las mismas presentaron diferencias significativas en este tiempo ( $p < 0.05$ ). En las comparaciones múltiples realizadas de forma binaria entre los diferentes grupos, se encontró que cada una de las variables tiene un comportamiento diferente. Al comparar los grupos agua y solución salina con el tratado con agua y vacuna, se comprobó que el área total de los folículos muestra diferencias significativas. Lo mismo sucedió al comparar el grupo agua y vacuna con el de etanol y vacuna.

Al realizar la comparación entre el grupo etanol y vacuna con el grupo de agua y solución salina no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, cuando se realizaron las comparaciones con respecto a la variable área central del folículo, los grupos que mostraron diferencias significativas difieren con respecto a lo encontrado en

el área total. En este caso solo mostraron diferencias significativas los grupos tratados con agua y vacuna con respecto al tratado con etanol y vacuna.

**Tabla 1.** Estadísticas de los folículos linfáticos en  $\mu^2 \times 10^3$  según grupo y tiempo de tratamiento.

GRUPO/ TIEMPO	AGUA Y SOLUCIÓN SALINA		AGUA Y VACUNA		ETANOL Y VACUNA	
	AT	AC	AT	AC	AT	AT
1 MES	N=11		N=09		N=09	
	$\bar{x}=96.8$	$\bar{x}=61.0$	$\bar{x}=49.3$	$X=43.6$	$\bar{x}=107.6^*$	$\bar{x}=65.0^*$
	S=101.3	S=32.3	S=24.3	S=53.9	S=90.7	S=30.7
2 MESES	N=09		N=10		N=10	
	$\bar{x}=135.6$	$\bar{X}=53.5$	$\bar{x}=59.3$	$\bar{X}=39.9$	$\bar{x}=165.9^*$	$\bar{x}=72.9^*$
	S=55.4	S=25.6	S=51.5	S=23.4	S=27.3	S=22.9

Leyenda: AT:área total del folículo; AC: área central del folículo,  $\bar{x}$ :media, S:desviación estándar

	1 MES		2 MESES	
GRUPO	$\lambda =.879$	$p=.513$	$\lambda =.454$	$\lambda=.000^*$
A. T	F= 1.455	$p=.252$	F= 14.153	$p=.000^*$
A. C	F= 1.017	$p=.376$	F= 4.773	$p=.017^*$

**Tabla 2.** Análisis del comportamiento de los efectos grupo, tiempo e interacción grupo tiempo.

EFECTOS	A T		A C	
	F	p	F	p
GRUPO	7.919	0.001*	4.389	0.017*
TIEMPO	4.294	0.043*	0.081	0.777
GRUPO/TIEMPO	0.454	0.638	0.484	0.619

Leyenda: AT Área Total del folículo; AC Área central del folículo

## DISCUSIÓN

La ingestión de etanol, aún a dosis moderada, provocó cambios en las variables morfométricas del bazo en los animales tratados por dos meses. Otros investigadores han señalado que el abuso en la ingestión de etanol provoca niveles alterados de citoquinas en el plasma, como es el caso del factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , la interleuquina  $\alpha$  y  $\beta$ , las interleuquinas 6, 8, y 12 y en tejidos como el pulmón, hígado y cerebro, así como cambios en el sistema inmune, como disminución de la respuesta a mitógenos de los linfocitos T y B, disminución de la inmunidad celular, de las células naturales asesinas y resistencia a patógenos.<sup>16, 17</sup>

En otro estudio se ha señalado que la ingestión de etanol causa disminución en las áreas corticales del timo<sup>11</sup>. También se ha reportado disminución de la actividad citolítica de las células naturales asesinas de los linfonodos en ratas machos adultas tratadas con altas dosis de etanol, así como disminución en la expresión de perforina y granzima B.<sup>17</sup>

Las ratas de la presente investigación tratadas con etanol y vacuna mostraron, por el contrario, un aumento en las variables área central y área total de los folículos, sobre todo en estas últimas, lo que puede interpretarse como un incremento del número de linfocitos según se explicará a continuación.

En primer lugar, se mantiene un amplio predominio de la pulpa blanca sobre la pulpa roja. En segundo lugar, los folículos primarios fueron numerosos. En tercer lugar, los folículos secundarios a los dos meses de tratamiento, presentaron áreas totales mayores que los de un mes y numerosos linfocitos agrupados formando infiltrados en la

pulpa roja. Todo esto evidencia que, en las ratas de la presente investigación, lejos de producirse una disminución de las poblaciones de células linfoides, éstas se mantienen en número elevado. Esto puede ser debido a la edad de los animales, dado que las ratas utilizadas estaban en la etapa de la adolescencia; etapa de plenitud en la función del sistema inmune<sup>11</sup>. Es probable que el etanol esté actuando como estimulante y no como supresor de la respuesta inmune como ha sido planteado por otros investigadores<sup>11, 16,18-20</sup>.

El cálculo de  $\lambda$  de Wilks a los valores de las áreas totales y centrales de los tres grupos permitió comprobar que al mes de tratamiento no se produjeron diferencias significativas entre los grupos en estudio; sin embargo, a los dos meses de tratamiento sí se produjeron diferencias en estas variables; lo cual indica que son tiempo dependiente, como ha sido reportado para otros órganos estudiados, como el riñón<sup>21</sup>.

Por otra parte, las comparaciones binarias realizadas mostraron que no existieron diferencias en las áreas totales y centrales de los folículos entre las ratas tratadas con solución salina y agua con relación a las tratadas con etanol y vacuna. En tanto que en las comparaciones binarias entre las ratas tratadas con etanol y vacuna, con respecto a las tratadas con agua y vacuna se comprobó que ambas presentaron diferencias significativas. Este hecho sugiere que, aunque las ratas alcohólicas responden a la vacuna, esta respuesta fue diferente a la mostrada por los animales que no ingirieron el tóxico, aspecto este que debe continuar investigándose para obtener respuestas más concluyentes. Con la dosis de etanol empleada y el tiempo de tratamiento establecido, se observan alteraciones morfométricas en el bazo y éstas se corresponden con un incremento de la actividad del sistema inmune.

## **CONCLUSIONES**

Por lo que se concluye que es posible que en esta etapa del ciclo vital el etanol posea un efecto estimulante sobre este órgano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anne-Pascale Le Berre, Rosemary Fama, and Edith V. Sullivan. Executive Functions, Memory, and Social Cognitive Deficits and Recovery in Chronic Alcoholism: A Critical Review to Inform Future Research. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017 Aug; 41(8): 1432–1443.
2. Richard L. Bell, Sheketha Hauser, Zachary A. Rodd, Tiebing Liang, Youssef Sari, Jeanette McClintick, Shafiqur Rahman, and Eric A. Engleman. A Genetic Animal Model of Alcoholism for Screening Medications to Treat Addiction. *Int Rev Neurobiol*. 2016; 126: 179–261.
3. Subhash C. Pandey, Evan J. Kyzar, and Huaibo Zhang. Epigenetic Basis of the Dark Side of Alcohol Addiction. *Neuropharmacology*. 2017 Aug 1; 122: 74–84.
4. Herrera Batista Aleida, Ruiz Candina Héctor, Martínez Betancourt Ayní. Caracterización del consumo de drogas psicoactivas por jóvenes y adolescentes atendidos en el Centro de Deshabitación de Adolescentes del municipio Playa. *Rev Cubana Invest Bioméd [revista en la Internet]*. 2014 Mar [citado 2018 dic 20]; 33(1): 61-69. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002014000100007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002014000100007&lng=es)
5. Ruiz Candina, Héctor, Herrera Batista, Aleida, Puldón Seguí, Giselle Enfermedades médicas y estomatológicas provocadas por el alcoholismo en adultos y adolescentes. Modelos animales. *Rev Cubana Invest Bioméd [Internet]*. 2012 Mar [citado 2018 dic 15]; 31(1): 26-36. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002012000100003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002012000100003&lng=es)
6. Ricardo González Menéndez y Gina Madelin Galán Beiro. El alcohol: la droga bajo Piel de cordero. *Rev. Hosp. Psiquiátrico de la Habana* 2007, 4(3) <http://www.revistahph.sld.cu/hph0307/hph030707.htm>
7. Fulton T. Crews, Ryan P. Vetreno, Margaret A. Broadwater, and Donita L. Robinson. Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior. *Pharmacol Rev*. 2016 Oct; 68(4): 1074–1109.

8. Singh Chuy L, Sarret Ramos M, Martínez Hodelin A, Espinosa Abreu M, Revilla Faure A. Comportamiento de la sexualidad en adolescentes. *Revista Información Científica* 2013; 77(1): 7-9.
9. Vetreno RP, Patel Y, Patel U, Jordan T W, and Crews F T. Adolescent intermittent ethanol reduces serotonin expression in the adult raphe nucleus and upregulates innate immune expression that is prevented by exercise. *Brain Behav Immun.* 2017 Feb; 60: 333–345.
10. Jessica J. Black, Duncan B. Clark, Christopher S. Martin, Kevin H. Kim, et al. Course of Alcohol Symptoms and Social Anxiety Disorder from Adolescence to Young Adulthood. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015 Jun; 39(6): 1008–1015.
11. Herrera Batista Aleida, Zumeta Dubé Melvis Taylín, González Bravo Maritza. Efectos del ácido fólico sobre algunas variables morfométricas del timo de ratas adolescentes con síndrome fetal Alcohólico. *Rev Cubana Invest Bioméd [Internet].* 2012 Mar [citado 2018 dic 24]; 31(1): 63-72. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002012000100007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002012000100007&lng=es).
12. Rojas Rodríguez Liana Yanet, Herrera Batista Aleida, Ruiz Candina Héctor Juan, Valenti Pérez Jaime. Efectos del ácido fólico sobre las características histológicas del páncreas en conejos alcohólicos adolescentes. *Rev haban cienc méd [Internet].* 2013 Dic [citado 2018 dic 24]; 12(4). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729519X2013000400004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729519X2013000400004&lng=es).
13. Miraval Edgar, Obando Diana, Lozano Oscar, Vela Manuel, Jurupe Hilda, Herencia Vilma. Efecto protector del *Petroselinum crispum* (Mill.) A.W. Hill (perejil) frente a la hepatotoxicidad crónica inducida con etanol en ratas albinas. *Rev. Fac. Med. Hum.* 2016; 16(3):21-29.
14. Tsukamoto, H, French S. W, Beaso N. Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. *Hepatology.* 1985; 5: 224-232.

15. Rodríguez R, Alarcón T.E, Sánchez L: MADIP un novedoso método. Rev de Información Científica y tecnológica. 2002; 7 (1) 1023-172: 31-34.
16. Jerrelles Thomas R, Pruett Sphen B. Immunotoxic effects of ethanol. Citado por Dean J H, Luster M I, Munson A E and Kimbar I Immunotoxicology and immunopharmacology. Second edition. Ltd New York: Raven Press; 1994.p. 323-46.
17. Hui Zhang, Zhaohui Zhu, Gary G. Meadows. Chronic alcohol consumption decreases the percentage and number of NK cells in the peripheral lymph nodes and exacerbates B16BL6 melanoma metastasis into the draining lymph nodes. Cell Immunol. 2011; 266(2): 172–179.
18. Pavón F J, Marco E M, Vázquez M, Sánchez L, et al. Effects of Adolescent Intermittent Alcohol Exposure on the Expression of Endocannabinoid Signaling-Related Proteins in the Spleen of Young Adult Rats. PLoS One. 2016; 11(9): e0163752. Published online 2016 Sep 23. doi: 10.1371/journal.pone.0163752. [PMC free article][PubMed].
19. Dokur M, Boyadjieva N, Sakar D.: Reduction of perforin, granzima B and cytokine interferon ganma by ethanol in male Fisher rats. Alcohol Clin Exp Res 2003; 27(4): 670-676.
20. Rajeshwara N. Achur, Willard M. Freeman, and Kent E. Vrana. Circulating Cytokines as Biomarkers of Alcohol Abuse and Alcoholism. J Neuroimmune Pharmacol. 2010 Mar; 5(1): 83–91. [PMC free article][PubMed]
21. Herrera Batista A, Puldón Seguí G, Ruiz Candina H. Alteraciones en las características morfológicas del riñón de ratas albinas machos provocadas por la ingestión crónica de etanol desde la adolescencia. Rev Cubana Invest Bioméd [Internet]. 2010 Jun [citado 2018 dic 16]; 29(2): 194-202. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002010000200004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002010000200004&lng=es)

**Recibido.** 12 de febrero de 2020

**Aceptado** 15 de abril de 2020

Aleida Herrera Batista. Calle 194 No 1511 A, entre 15 Y 17 Siboney Playa. La Habana, Cuba. Teléfono 7 2716492 Correo electrónico: [aleidajosefa@infomed.sld.cu](mailto:aleidajosefa@infomed.sld.cu)