

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS BOTUCATU**

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E DO  
ALCOOLISMO SOBRE A VESÍCULA SEMINAL E A  
GLÂNDULA DE COAGULAÇÃO DE RATOS UCh  
(BEBEDORES VOLUNTÁRIOS DE ETANOL A 10%)**

**FABIANA MARCONSINI**

**Botucatu - SP  
2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS BOTUCATU**

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E DO  
ALCOOLISMO SOBRE A VESÍCULA SEMINAL E A  
GLÂNDULA DE COAGULAÇÃO DE RATOS UCh  
(BEBEDORES VOLUNTÁRIOS DE ETANOL A 10%)**

Fabiana Marconsini

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Coorientadora: Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre no  
Programa de PG em Biologia Geral e  
Aplicada.**

Botucatu - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus**

Marconsini, Fabiana.

Efeitos da separação materna e do alcoolismo sobre a vesícula seminal e a glândula de coagulação de ratos UCh (bebedores voluntários de etanol a 10%) / Fabiana Marconsini. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Co-orientadora: Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Assunto CAPES: 20100000

1. Reprodução humana - Aspectos biológicos 2. Vesículas seminais - Aspectos bioquímicos 3. Estresse 4. Alcoolismo

CDD 611.63

Palavras-chave: Etanol; Glândula de coagulação; Ratos UCh; Separação materna; Vesícula seminal

**"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar,  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.**

**Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.**

**Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."**

Martin Luther King

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a Deus, Jesus e Maria... não somente pelo dom da vida, mas por ter  
iluminado meus caminhos e me guiado...

Aos meus pais, pelos valiosos exemplos e ensinamentos!

Ao meu irmão e minha cunhada, pela amizade e companheirismo!

As minhas sobrinhas, por todas as alegrias!

A minha nona, pela sua vontade de viver!

Essa conquista é nossa... amo muito vocês!!!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me iluminou e me mostrou o caminho, compreendendo meus anseios e me dando coragem quando necessário... enfim por tudo que proporcionou em  
minha vida!

Aos meus pais, Elisabete e Lauro, que se fizeram presentes, mesmo distantes, nos momentos mais difíceis, sempre me apoiando e incentivando a continuar... e principalmente por ter acreditado nos meus sonhos e me ajudar a realiza-los!  
Ao meu irmão Deoclécio e minha cunhada Lilian, pela amizade que me dedicaram e pelo companheirismo nos momentos de alegria e tristeza.

As minhas sobrinhas, Caroline e Gabriela, pela amizade, pelas brincadeiras e por me fazer acreditar que sempre existe um amanhã!

Ao Pedro, por tudo... mas principalmente pelo carinho que me destes e pelo simples e importante fato de estar ao meu lado em todos os momentos... e me fazer acreditar que era possível, quando tudo se apresentava inviável!

A minha super amiga Adriana, não apenas pelos conselhos incansáveis e pela grande amizade, mas por se fazer presente na minha vida... Eu te adoro!

A minha amiga Juliana, pelo apoio incondicional e pela grande amizade que me tem dedicado!

Aos meus bichinhos de estimação que tanto adoro, Pitty (in memoriam), Pedrita, Pepí e Pituxo, companheiros de todas as horas!

Aos meus amigos Jéssica e Daniel, por todos os momentos juntos tanto de alegria, como de tristeza... pelos conselhos, carinho, amizade, companheirismo, baladas, terere com pipoca, ressaca... por tudo...

Aos meus amigos da Kissassa, Marcio, João Paulo, Domingos, Paulo, José Pedro, Helanderson... pela hospedagem e amizade!

Aos amigos da Liga do Chopp (Mariana, Pátilla, Tátilla, Karina, Talita, Tatiane, Camila, Fernanda, Pamela, André, Felipe, Luciano, Rafael, Junior, Daniel, Thiago, Vanda, Simone, Solange, Danilo, Rodrigo, Rogério, Daniel, Wesley, Francisco), pelo trabalho em equipe, por tudo de bom que vivemos juntos!

Ao professor Francisco, pela orientação e se mostrar mais do que um mestre, mas um exemplo de docente e pesquisador que me conduziu tornando possível esta conquista.

A professora Patrícia pela coorientação ao longo do caminho para o conhecimento e crescimento pessoal, a qual sempre será minha referência em todos os aspectos da vida, e a quem tenho um carinho muito especial!

A professora Josiane por ser sempre meu exemplo de pessoa e profissional (docente e pesquisadora)... jamais esquecerei seus ensinamentos...

Ao colaborador Otávio, pela amizade e aprendizagem!

Aos pós-graduandos, Gustavo, Giovana, Leonardo, João, Beatriz que foram mais que colaboradores, são meus amigos, por todos os momentos de trabalho e descontração...

Ao auxiliar acadêmico Gelson, pelo auxílio na execução do projeto, pela amizade, mas principalmente por todos os sorrisos e brincadeiras!

As secretárias Jeruza e Cleuza, por toda contribuição e amizade.

Aos docentes do Depto de Anatomia e membros do grupo de pesquisa Biologia da Reprodução por todo o crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários da Secção de PG, pela amizade e contribuição!

Agradeço ao IBB/UNESP e ao corpo docente, por ter me acolhido e pelos conhecimentos transmitidos ao longo desta PG.

Aos amigos do Laboratório de Bio-Saúde da Uniamérica, pela amizade e apoio!

A todos que de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho e a conquista de mais um sonho, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	08
<i>ABSTRACT</i> .....	09
I. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Alcoolismo .....	10
1.2 Metabolismo do álcool .....	11
1.3 Modelos experimentais de alcoolismo .....	12
1.4 Efeitos do etanol no sistema genital masculino .....	13
1.5 Vesícula seminal e glândula de coagulação .....	15
1.5.1 Desenvolvimento.....	15
1.5.2 Estrutura .....	17
1.6 Estresse.....	21
1.7 Justificativa .....	25
1.8 Objetivos gerais.....	26
1.9 Objetivos específicos.....	26
II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
III. ARTIGO .....	37
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62

## RESUMO

Experiências adversas na infância estão associadas ao abuso de álcool e de outras drogas na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse. A exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e, concomitantemente, reduz a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG). Assim, sabe-se que estresses sociais e ambientais produzem os efeitos deletérios na função reprodutiva. No entanto, a maior parte dos trabalhos relacionando os efeitos deletérios do estresse sobre as funções reprodutivas masculinas está direcionada para a investigação de hormônios, raros são os relatos sobre aos efeitos do estresse sobre a vesícula seminal e glândula de coagulação. Pouco é conhecido sobre a complexa relação entre o estresse, o alcoolismo e as alterações dos genitais masculinos. Considerando as linhagens de ratos UCh, o conhecimento da alteração do eixo hipotálamo-hipófise-testículo e estresse durante a seleção das linhagens UCh, despertou-se interesse na investigação do estresse neonatal sobre a vesícula seminal e glândula de coagulação destas linhagens, já que as alterações morfofisiológicas sobre os sistemas genitais masculino e feminino foram confirmadas. Além do que, muitos fatores observados no alcoólico podem ser frutos do estresse vivido precocemente, os quais podem estar potencializados ou não no homem adulto. Dessa forma, o presente trabalho propõe investigar e avaliar se há interação entre a separação materna e o alcoolismo sobre a estrutura da vesícula seminal e glândula de coagulação de ratos machos UCh. Metodologia: avaliação hormonal das concentrações plasmáticas de testosterona e corticosterona, análise estrutural, morfométrica, da proliferação celular da vesícula seminal e glândula de coagulação e imuno-histoquímica para proteína p63 e receptores de andrógenos. A separação materna altera a estrutura epitelial da vesícula seminal e glândula de coagulação e as concentrações plasmáticas de testosterona e corticosterona. Conclui-se que há interação entre a separação materna e a ingestão de etanol sobre a vesícula seminal e glândula de coagulação, atuando sobre os eixos HHG e HHA, podendo levar a potencialização das respostas sobre a reprodução.

Palavras-chave: etanol, separação materna, vesícula seminal, glândula de coagulação, ratos UCh



**ABSTRACT**

In childhood, traumatic experiences are associated with alcohol and other drugs dependence in adolescence and adult life. Maltreated children and teenagers display biological disturb related in response to stress. Chronic exposure to stressfull factors increases the activity of the hypothalamic-hypophyseal-adrenal (HHA) axis and also reduces the activity of the hypothalamic-hypophyseal-gonadal (HHG) axis. Thus, it is know that social and environmental stressing factors produce impairing effects on reproductive functions. However, the most part of studies related to the harmful effects of stress on the seminal vesicle and coagulating gland are quite rare. Little is known about the complex association among stress, alcoholism and male genital alterations. Considering the UCh rat lineage, the knowledge on its hypothalamic-hypophyseal-testicular axis alterations and the stress during UCh strain selections, there was an interest in investigating the effects of neonatal stress on the seminal vesicle and coagulating gland of this lineage, since morphophysiological alterations in both male and female genital tracts have already been reported. Futhermore, many of the factors seen in alcoholism may be a result of early stress, which can be potentialized or not in the adult man. Therefore, the present work has the purpose to investigate and evaluate whether maternal separation and the alcoholism interposes on the seminal vesicle and coagulanting gland of the UCh rats. Methods: plasmatic testosterone and corticosterone levels evaluation, morphometric analysis of the cell proliferation, p63 protein and androgen receptor immunohistochemistry. Concluded that there is an interaction between the maternal separation and ethanol consumption on the seminal vesicle and coagulating gland, acting on the HHG and HHA axis, which might it be leading to large response of the reproduction.

Keywords: ethanol, maternal separation, seminal vesicle, coagulating gland, UCh rat

## **I - INTRODUÇÃO**

### **1.1 Alcoolismo**

O alcoolismo é uma doença mundial que impulsiona os indivíduos ao hábito para obtenção do alívio das tensões psico-emocionais e também pela libertação de desconfortos físicos. Trata-se de uma patologia que possui um dos diagnósticos clínicos mais freqüentes, causando morbidade e morte prematura (PURPITZ-FILHO, 1987).

GIACHETI (1996) conceitua o alcoolismo como o conjunto de fatores patológicos e psicológicos que podem levar ao consumo excessivo e a dependência crônica de etanol. Segundo a CID 10 (Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde), o alcoolismo consiste numa ingestão abusiva ou prolongada de bebidas alcoólicas, a ponto de criar hábito, dependência ou vício causando transtornos mentais e corporais.

O consumo de bebidas alcoólicas é comum e faz parte do hábito e da cultura no mundo atual. A quantidade de álcool consumida determina o uso social ou indiscriminado desse hábito. O etanol ou álcool etílico é uma substância psicoativa capaz de produzir alterações no funcionamento do sistema nervoso central (SNC), podendo provocar alterações no comportamento dos indivíduos consumidores. Por ter efeitos prazerosos, induz a repetição (BRASIL, 1994).

Devido à industrialização, houve aumento significativo da produção de bebidas alcoólicas e de sua distribuição, intensificando o consumo pela facilidade de comercialização e obtenção. O abuso no consumo de álcool tem provocado o aumento nos problemas médicos e psicossociais relacionados as síndromes alcoólicas. Em decorrência do uso abusivo do álcool observa-se o aumento da morbidade e da mortalidade (LIMA, 1997). A dependência de álcool acomete 10 a 12% da população mundial e 15 a 20% da população brasileira (LARANJEIRA, 2003).

Os problemas relacionados ao consumo de etanol são comparados aos causados pelo consumo de tabaco e pela prática de sexo sem proteção. As complicações relacionadas ao consumo de etanol não estão necessariamente relacionadas ao uso crônico. Intoxicações agudas, além de trazer riscos diretos à saúde, entre outras conseqüências, deixam os indivíduos mais propensos a acidentes de trânsito, diminui o rendimento escolar, modifica o comportamento social (LARANJEIRA, 2003). Assim, as complicações oriundas do consumo de álcool, tanto físicas como psíquicas, têm repercussão no meio social, sendo

considerado um dos mais graves problemas de saúde pública no Brasil (FORTES & CARDO, 1991).

Os vários tipos de bebidas alcoólicas apresentam características hidrofílicas, chegando a ser 30 vezes mais solúvel em água do que em lipídios. Apesar de sua característica hidrofílica, o etanol tem capacidade de difundir-se facilmente por entre as membranas biológicas, com exceção da pele, e, principalmente, através da mucosa gastrointestinal. Também pode difundir-se, em menor parte, através do epitélio pulmonar por inalação e através da bexiga urinária (GEOKAS et al., 1981; KALANT, 1983; CLAIR, 1991).

## **1.2 Metabolismo do etanol**

O álcool é consumido devido ao seu efeito psicoativo, porém existem fatores que influenciam seu metabolismo e determinam seu efeito tóxico, portanto, suas ações nocivas são mediadas por seus metabólitos (CALLABERÍA, 2003).

Devido a sua grande capacidade de difusão, o etanol incorpora-se a todos os líquidos corpóreos, leite materno, líquidos amniótico e ascítico, humor vítreo, líquido, bile, urina, saliva, placenta, podendo apresentar-se extra e intracelular (GEOKAS et al., 1981; KALANT, 1983; CLAIR, 1991). Do total de etanol absorvido por difusão, 80 a 90% é metabolizado no fígado, dois a 10% é excretado de forma inalterada pelos rins, pulmões, suor ou saliva (CLAIR, 1991), sendo que o restante é metabolizado no cérebro e músculos estriados esqueléticos (FORTES, 1975).

O metabolismo do etanol ocorre no fígado e produz substâncias tóxicas, como o acetaldeído e o acetato, que podem prejudicar ou impedir a capacidade hepática de metabolizar outras substâncias, incluindo esteróides, vitaminas, nutrientes e compostos orgânicos estranhos ao organismo (PALMER, 1989).

No hepatócito há três vias metabólicas com a capacidade de oxidar o etanol em aldeído acético. Na 1ª via o etanol é convertido a aldeído acético pelo sistema da enzima álcool desidrogenase, que é principal enzima envolvida na oxidação do etanol (75 a 90%). Na 2ª via aproximadamente 25% do etanol é oxidado pelo sistema microsomal (MEOS) presente no retículo endoplasmático liso. A 3ª via de oxidação do etanol envolve a enzima catalase, localizada nos peroxissomos, responsável por apenas 10% da oxidação do etanol. Na segunda etapa, o acetaldeído é convertido em acetato e água, principalmente, através da

enzima acetaldéido desidrogenase, encontrada no citosol e na matriz mitocondrial do hepatócito (PURPITZ-FILHO, 1987).

### **1.3 Modelos experimentais de alcoolismo**

Na literatura científica especializada há muitos relatos de pesquisas que se utilizam modelos animais experimentais no estudo de patologias humanas. Os roedores constituem um dos modelos experimentais mais utilizados no estudo do alcoolismo, permitindo aos pesquisadores conduzir os experimentos sem dificuldades e problemas éticos.

Desde a década de 40, pesquisadores têm conduzido pesquisas com roedores que possuem preferências ao consumo de etanol. Esses estudos relatam que ratos e camundongos bebem mais álcool do que água em concentrações baixas de álcool (até 6% v/v), pelo fato da solução de etanol apresentar sabor doce. Entretanto, em experimentos onde foram oferecidas aos animais concentrações elevadas de etanol, observaram-se diferenças entre indivíduos e entre as linhagens na preferência pela ingestão de álcool. Essas observações sugerem que os animais preferem primeiramente o álcool pelo sabor que pelo seu efeito estimulador sobre o sistema nervoso central (SPANAGEL, 2000).

A alta variabilidade na preferência ao etanol entre os indivíduos e entre as linhagens permitiu aos estudiosos selecionarem linhagens de ratos e camundongos para a preferência ao etanol, gerando pares de animais que são caracterizados por consumir níveis baixos ou altos de álcool (SPANAGEL, 2000).

QUINTANILLA et al. (2001) relataram a existência de linhagens de animais com preferência ao consumo de álcool ou aversão. Segundo os autores, os consumidores voluntários apresentam propensão genética para beber alta quantidade de álcool determinada por múltiplos genes que regulam fatores neurobiológicos de predisposição. A aversão ao etanol é indicada pela redução no consumo pelo gosto da solução em exposições consecutivas.

Na literatura são descritas duas variedades de ratos originadas da linhagem Wistar que consomem baixa quantidade de etanol (UChA) e alta quantidade de etanol (UChB). Nos ratos UChB o etanol pode exercer propriedade eufórica ou satisfatória, por outro lado nos ratos UChA mostrou-se estimulante com relação a atividade locomotora, não sendo verificado em ratos UChB (MARDONES & SEGOVIA-RIQUELME, 1983 QUINTANILLA & TAMPIER, 1995; QUINTANILLA et al., 2001).

A quantidade de etanol consumida por ratos Wistar machos está associada à atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) no cérebro. Os ratos UChB (bebedores voluntários geneticamente selecionados para o consumo de alta quantidade de etanol) exibem maior atividade da enzima ALDH do que os UChA (bebedores voluntários geneticamente selecionados para o consumo de baixa quantidade de etanol) (QUINTANILLA & TAMPIER, 1995).

A linhagem UCh é considerada um modelo raro para pesquisa experimental e estudos dos fatores genéticos, ambientais, bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos, nutricionais e comportamentais relacionados aos efeitos do álcool e sua consequente relação ao alcoolismo humano (QUINTANILLA et al., 2006; TAMPIER et al., 2000).

As linhagens de ratos *Sardinian alcohol-nonfrererring* (SNP) e *Sardinian alcohol-preferring* (SP), seletivamente originadas de ratos Wistar, juntas constituem mais um exemplo de modelos experimentais para o estudo comparativo de preferência e consumo de álcool. Nesses animais verificou-se que a exposição precoce ao álcool pode provocar mudanças na vocalização ultra-sônica durante a atividade de corte e cópula, interferindo na motivação sexual. Os ratos SNP e SP são considerados ferramentas valiosas para avaliar as influências da sensibilidade ao álcool no neurocomportamento, sugerindo que fatores genéticos poderiam contribuir para variabilidade de resultados observados depois da ingestão gestacional do abuso de drogas (CACIANO et al., 1998; LI et al., 2001).

As linhagens AA (*Alko Alcohol*) e ANA (*Alko Nonalcohol*) de Helsinki (Finlândia) foram obtidas por cruzamentos alternados *inbreeding* com *outbreeding*. As linhagens P (*Alcohol Preferring-5-8g/kg/day*) e NP (*Non-Alcohol-Preferring - menos de 0,5g/kg/dia*) originados em Indianápolis (EUA) são modelos experimentais de ratos que exibem preferência ou aversão ao consumo voluntário de etanol.

#### **1.4 Efeitos do etanol no sistema genital masculino**

Diversos distúrbios generalizados provocados pela ingestão do etanol e pela ação de seus metabólitos são relatados em vários sistemas orgânicos incluindo os sistemas nervoso, circulatório, digestório, urinário e genital. O etanol age diretamente no fígado, pâncreas, intestinos, glândulas endócrinas e glândulas sexuais acessórias (KORSTEN & LIEBER, 1979; HIRATA & HIRATA, 1991, GOMES et al., 2002; FÁVARO & CAGNON, 2006; CÂNDIDO et. al., 2007).

Os efeitos nocivos do etanol no sistema genital masculino têm sido demonstrados através de vários métodos para a indução do alcoolismo. Uma das conseqüências do alcoolismo é o hipogonadismo que é observado no homem e nos animais de laboratório. O etanol pode agir diretamente nas gônadas alterando a síntese de testosterona testicular e também agir indiretamente provocando mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (FÁVARO & CAGNON, 2006; CÂNDIDO et al., 2007). BANNISTER & LOSOWSKY (1987) e ADLER (1992) relatam que a síntese de testosterona é comprometida no alcoolismo, pois o etanol e seus metabólitos reduzem a concentração de receptores do hormônio luteinizante nas células de Leydig no interstício do testículo humano.

Segundo KIM et al. (2003), o etanol inibe a função reprodutiva em humanos, macacos e em pequenos roedores e atua em vários locais provocando a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG), a inibição da liberação do hormônio luteinizante (LH) e diminuição da testosterona. Os autores sugerem que o etanol atua primariamente no hipotálamo. Portanto, a administração prolongada de etanol resulta em inibição da atividade reprodutiva de ratos machos no eixo HHG. A principal implicação é a supressão de GnRH (hormônio liberador de gonadotropina) no hipotálamo, causando a diminuição da testosterona. Sabe-se que as estruturas das glândulas sexuais acessórias são dependentes de testosterona, secretada pelas células de Leydig dos testículos e metabolizada nas células em estradiol (pela aromatização) e diidrotestosterona (pela  $5\alpha$ -redutase). Desse modo, o principal hormônio para a atividade do comportamento sexual em ratos machos é o estradiol, resultante da aromatização. Em relação à absorção crônica de doses moderadas de etanol, CACIANO et al. (1998) sugerem não ter efeitos a curto ou longo prazo na atividade copulatória de ratos machos. Essas doses moderadas de etanol não produzem tolerância nem dependência, portanto, não tem efeitos adversos consistentes na função sexual de ratos, mas observam-se diferenças em relação ao perfil da síndrome comportamental obtida em comparação com animais modelos de dependência de etanol.

Um dos impactos sociais do álcool é a infertilidade, de grande importância para a sociedade, especialmente no caso de consumidores crônicos cujos problemas com bebidas são originados durante a adolescência. BAUMBACH (2002) relata que metade dos adolescentes e adultos expostos ao álcool no período pré-natal demonstram comportamento sexual inapropriado, conceituado por problemas no avanço sexual. As principais alterações morfofisiológicas observadas foram lesões nas células testiculares ou atrofia testicular, diminuição na concentração espermática, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, dos níveis séricos de testosterona, redução do peso das glândulas sexuais acessórias e redução

da altura das células epiteliais secretoras da vesícula seminal, lobo dorsal e lateral da próstata. Esses efeitos podem levar a infertilidade, impotência sexual (por diminuição da testosterona), redução de libido, feminilização (diminuição das características secundárias masculinas), ginecomastia e hipogonadismo (BOYDEN & PAMENTER, 1983; PURPITZ-FILHO, 1987; RAMOS & BERTOLOTE, 1997; LARANJEIRA et al., 2000; FÁVARO & CAGNON, 2006; OLIVA et. al., 2006).

Os problemas na qualidade do sêmen, na ereção e na ejaculação são alterações que também são freqüentemente associadas ao alcoolismo. PUROHIT (2000) verificou que a ação direta e indireta do etanol leva a diminuição do volume seminal e da quantidade de espermatozoides. Para MONOSKI et al. (2002) a ingestão de álcool socialmente não interfere diretamente na qualidade do sêmen. A disfunção erétil observada em indivíduos que ingerem o álcool de forma abusiva está relacionada à queda na concentração de testosterona que reduz a inervação peniana (BUFFUM, 1983).

## **1.5 Vesícula Seminal e Glândula de Coagulação**

### **1.5.1 Desenvolvimento**

As glândulas sexuais acessórias têm sido órgãos de especial interesse de investigadores há anos. Trabalhos experimentais que avaliam as glândulas sexuais acessórias têm sido estimulados pelo problema do carcinoma prostático, da hiperplasia prostática benigna e também por alterações decorrentes do uso abusivo de drogas como o tabaco e o álcool. Extensa literatura tem abordado tais fatos e tem sido em parte revista (PRICE, 1963; VILLERS et al., 1991; FÁVARO & CAGNON, 2006).

Todos os mamíferos machos possuem uma ou mais glândulas sexuais acessórias, as quais têm sido classificadas de acordo com sua posição anatômica e função em animais adultos. Exemplos da primeira categoria são a próstata e a glândula bulbouretral, da segunda, a vesícula seminal e a glândula de coagulação. (PRICE, 1963).

A morfogênese da próstata e da vesícula seminal é regulada por sinais endócrinos, interações locais célula-célula e padrões genéticos específicos. O sistema genital masculino se desenvolve a partir dos ductos de *Wolff* e do seio urogenital (SUG). O ducto de *Wolff* surge a partir da mesoderme, originando os epidídimos, os ductos deferentes, as vesículas seminais e o ducto ejaculatório. O SUG, surgido da endoderme, origina a próstata, as glândulas bulbouretrais, a uretra e as glândulas periuretrais. O túbulo mesonéfrico dá

origem somente aos ductos eferentes (CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2004; THOMSON & MARKER, 2006).

O SUG é circundado por tecido conjuntivo embriogênico denominado mesênquima do seio urogenital (MSU). O mesênquima induz a morfogênese epitelial, regula a proliferação epitelial, promove diferenciação celular e induz funções epiteliais específicas ou atividades bioquímicas. (CUNHA et al., 1992; ALARID et al., 1994; DOHLE et al., 2003). Antes da diferenciação sexual do SUG, o MSU expressa receptores de andrógenos em ambos sexos e adquire a capacidade do desenvolvimento masculino em resposta aos andrógenos testiculares fetais.

A primeira mudança morfológica indicativa do desenvolvimento da próstata é a formação dos botões epiteliais prostáticos observados no camundongo por volta do 17º dia de vida pré-natal e no rato no 19º dia do desenvolvimento pré-natal. Ocorrem eventos de proliferação e ramificação dos ductos e o crescimento dos componentes concomitante dos elementos mesenquimais e epiteliais. O resultado final é o padrão de ductos constituídos por uma camada de células epiteliais e outra camada de músculo liso que são conectados uns aos outros pelo tecido conjuntivo frouxo. Em humanos, o epitélio ocorre inteiramente dentro da massa sólida do MSU que se diferencia em estroma fibro-muscular que preenche o espaço entre ductos (THOMSON & MARKER, 2006; FOSTER & CUNHA, 2008).

Nos roedores, os botões epiteliais não são ramificados no nascimento. Entretanto, na vida neonatal, os ductos prostáticos alongam-se em direção ao mesênquima do seio urogenital, formando três lobos prostáticos distintos e simetricamente bilaterais: anterior (glândula de coagulação), ventral e dorsolateral (CUNHA et al., 1987). Concomitantemente ao processo de morfogênese de ramificação ductal ocorre a citodiferenciação do epitélio e do estroma nas primeiras semanas após o nascimento. As células epiteliais que se desenvolvem dos “botões epiteliais” são caracterizadas pela co-expressão de citoqueratinas 5, 8, 14 e 18 e p63 (WANG et al., 2001). O alongamento desses “cordões epiteliais” em direção ao mesênquima é resultante da intensa atividade de proliferação celular (SUGIMURA et al., 1986).

Os botões epiteliais iniciais da vesícula seminal formam tubos a partir do ducto de *Wolff* antes do nascimento. A glândula de coagulação (próstata anterior) cresce em associação com a vesícula seminal. Após o nascimento, os tubos iniciais desenvolvem ramificações laterais que crescem e se ramificam secundariamente. A morfogênese de ramificação da próstata e da vesícula seminal é completada na segunda semana após o nascimento, porém a próstata continua acumulando aos poucos novos ramos até a



puberdade onde se completa. (CUNHA et al., 2004; THOMSON & MARKER, 2006; FOSTER & CUNHA, 2008).

### 1.5.2 Estrutura

A próstata do rato é constituída por quatro pares de lobos situados ventralmente, dorsalmente e lateralmente (BOSLAND et al., 1998). Segundo esses autores a glândula de coagulação é uma diferenciação da próstata anterior, distinguindo-se dos outros lobos. Outros autores consideram a glândula de coagulação como: lobo anterior da próstata (CAVAZOS, 1975); lobo dorsocranial da próstata (HEBEL & STROMBERG, 1986) ou como uma estrutura independente da próstata localizada dorsalmente na face côncava da vesícula seminal (DAHL et al., 1973; CHOW & PANG, 1989). A glândula de coagulação está presente em diversos animais como hamster, rato, cobaia, coelho e macaco.

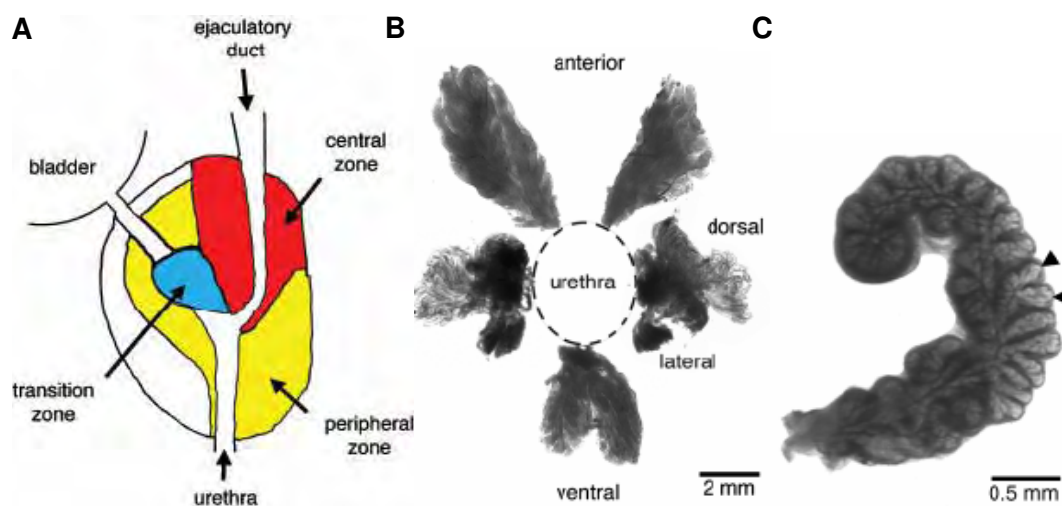


Fig. 1 - Divisões morfológicas da próstata humana e de rato. (A) Esquema da próstata de humano adulto - Anatomia da próstata humana é baseada em modelos de zonas conforme a arquitetura dos ductos (McNeal, 1983). (B) Rato Adulto – Anatomia da próstata de rato é baseada em lobos denominados anterior, dorsolateral e ventral, conforme sua localização anatômica. (C) Rato adulto – morfologia da vesícula seminal (THOMSON & MARKER, 2006).

A próstata de ratos, incluindo a glândula de coagulação, e a próstata de humanos possui células epiteliais colunares que secretam fluídos e proteínas. Nos humanos, o epitélio prostático exhibe uma camada contínua de células basais entre as células secretoras

e a membrana basal. Nos ratos as células basais constituem uma camada descontínua e apresentam-se em menor número (ROY-BURMAN et al., 2004).

Na próstata de ratos e camundongos, as células musculares lisas formam cordões imediatamente ao redor dos ductos epiteliais. Em humanos, o músculo liso é amplamente distribuído em todo o estroma. A próstata humana tem estroma fibromuscular robusto e do rato um componente estromal modesto. A associação dos feixes de fibras musculares com os ductos epiteliais é responsável pela secreção. Ao contrário da próstata, o epitélio da vesícula seminal é separado do músculo liso pelo tecido conjuntivo frouxo, denominado lâmina própria. Portanto, a próstata de ambas espécies são compostas de glândulas e ductos, mas existe significativa diferença no estroma. (HAYWARD et al., 1996; ROY-BURMAN et al., 2004).

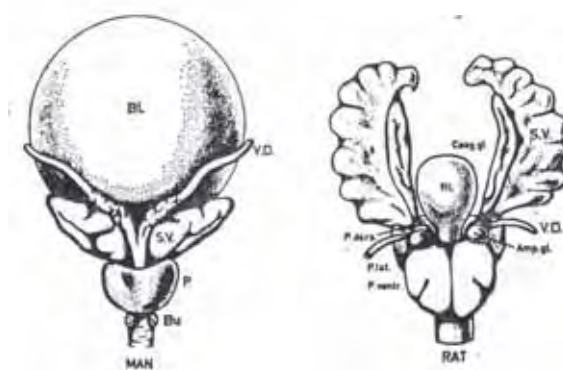


Fig. 2 – Comparação das glândulas sexuais acessórias do homem e do rato. **(MAN)** Vista dorsal – homem adulto, bexiga urinária (B.L.), ductos deferentes (V.D.), vesícula seminal (S.V.), próstata (P), glândula bulbouretral (B.u.). **(RAT)** Vista ventral – rato adulto, bexiga urinária (B.L.), ductos deferentes (V.D.), vesícula seminal (SV), glândula de coagulação (Coag. gl.), glândula ampulária (Amp.gl.), próstata ventral (P.ventr.), próstata lateral (P.lat.), próstata dorsal (P.dors.) (STOCKHOLM, 1965).

A glândula de coagulação do rato apresenta-se como um tubo enovelado, revestido por uma camada de tecido conjuntivo frouxo. Possui camada mucosa pregueada revestida por epitélio secretor colunar simples que se apóia em lâmina própria. Fibras musculares lisas se distribuem em direção circular e longitudinal á luz do órgão (CAGNON et al., 1996).

A vesícula seminal é uma glândula que varia consideravelmente entre as espécies e em alguns mamíferos está ausente, como em: monotremados, marsupiais, carnívoros, cetáceos e em alguns tipos de insetívoros, lagomorfos e primatas. No humano, a vesícula seminal humana é composta por túbulos alveolares contendo secreção viscosa. Seu desenvolvimento se dá a partir do bulbo dorsolateral do ducto mesonéfrico e pode ser identificado no quarto mês de vida intra-uterina (GONZALES, 1989).

As vesículas seminais do rato são formações irregulares, volumosas e lobadas, achatadas dorsoventralmente com pólo proximal direcionado caudalmente. O epitélio secretor da vesícula seminal é pseudo-estratificado e apresenta duas populações de células: basais e principais. As células basais estão dispostas inferiormente às células principais, apresentam núcleos poligonais e centrais com superfícies separadas da luz pelo ápice das células principais. As células principais são colunares com núcleos basais, sendo maiores e mais numerosas que as células basais. A mucosa, camada interna, forma conjunto de dobras, com epitélio secretor apoiado sobre lâmina própria, composta de feixes de fibras colágenas entrelaçadas. A camada média, muscular, é constituída por feixes de fibras musculares lisas, de espessura variável dispostas em dois extratos: circular interno e longitudinal externo. A camada externa, serosa, é delgada e composta de tecido conjuntivo frouxo. Cada glândula apresenta único ducto que desemboca na uretra (GUDE et al., 1982; HEBEL & STROMBERG, 1986; MARTINEZ et al., 1992; MARTINEZ et al., 1995). O lado ventromedial da vesícula seminal apresenta-se côncavo e aderido à glândula de coagulação.

A próstata e a vesícula seminal são as maiores glândulas sexuais acessórias que produzem os componentes do plasma seminal em mamíferos. Os volumes relativos e componentes do plasma seminal variam drasticamente entre espécies (THOMSON & MARKER, 2006). O volume do ejaculado normal humano varia entre 2 e 6 mL, sendo composto por espermatozóides e plasma seminal. O plasma seminal contém estrógeno e testosterona, prostaglandinas e glicoproteínas, incluindo citocinas e fatores de crescimento. Essas moléculas unem-se a receptores nas células alvo no trato reprodutivo feminino, ativando mudanças na expressão gênica levando a modificações na composição celular, estrutura e função de tecidos locais e distantes do trato (ROBERTSON, 2005). SUZUKI et al. (2007) afirmaram que o ejaculado é composto pela secreção da vesícula seminal (fluido seminal), da próstata contendo PSA (*prostate-specific antigen*) e do epidídimo contendo espermatozóides.

O fluído seminal humano é composto por duas proteínas semenogelina (Sg) I e II e fibronectina. Depois da ejaculação, o coágulo do fluído seminal mistura-se ao fluído prostático, promovendo a liquefação do sêmen através da fragmentação da Sg pelo PSA e formação do complexo entre PSA e PCI (*protein C inhibitor*). Portanto o PCI pode controlar a degradação do Sg pelo PSA no plasma seminal, sendo que a motilidade dos espermatozóides aumenta progressivamente com o processo de fragmentação resultando na liquefação do sêmen. O PCI parece desempenhar papel na regulação da fertilização pela inibição PSA e *acrosin* e, pela inibição de proteases no ovário. As proteínas Sg I e II representam 20 a 40% das proteínas do plasma seminal e modulam a motilidade espermática e aquisição na habilidade de fertilização (LAMIRANDE, 2007; METAFORA et al., 2007).

O plasma seminal pode não conter fatores essenciais para a fertilização, mas as secreções podem proporcionar condições favoráveis a motilidade espermática, a sobrevivência e transporte dos espermatozóides no sistema genital masculino e feminino. Durante muitos anos, o plasma seminal foi considerado apenas meio de transporte e sustentação às células espermáticas. Atualmente, estudos experimentais adicionando o plasma seminal de machos de alta fertilidade às células espermáticas de machos de baixa fertilidade têm provado a importância desse fluído na fertilidade *in vivo* (SOUZA, 2007).

A vesícula seminal parece ser importante na regulação da fertilidade, pois sua secreção estimula diretamente a motilidade dos espermatozóides, porém não é considerada totalmente indispensável. A queda na coagulação é relacionada à baixa atividade da vesícula seminal. Quando a coagulação é pobre, a motilidade espermática diminui depois da ejaculação, enquanto amostras com boa coagulação mantêm a motilidade espermática até 8h após ejaculação. O fenômeno da coagulação do plasma seminal é observado em todas as espécies com maior ou menor tempo para que a liquefação ocorra. No homem, o plasma seminal é totalmente liquefeito em 15 a 30 minutos depois da ejaculação (GONZALES, 1989).

A concentração e a composição das proteínas varia consideravelmente entre as espécies. Há relação entre o local de deposição do esperma e a natureza da composição. Em humanos, macacos, touro, os espermatozóides são depositados na vagina e as proteínas apresentam fatores comuns de concentração e composição. Em ratos, coelhos, porcos, os espermatozóides são depositados diretamente no útero e apresentam fatores diferentes da concentração e composição das proteínas. Esse fato indica a relação entre o

espermatozóide e o plasma seminal na migração do espermatozóide no sistema genital feminino (CLAVERT et al., 1990).

A glândula de coagulação do rato, considerada análoga à zona central da próstata de humanos, produz secreção rica em frutose, vesiculases, proteína dorsal I e II e transglutaminases. A transglutaminase (TG) 4 induz a formação do plugue copulatório vaginal após a copula, pela ligação de proteínas da vesícula seminal I e V que são secretadas pelo epitélio da glândula. A proteína da vesícula seminal (SV) IV é substrato para o TG4. Inicialmente o TG4 cataliza a ligação entre SV – I e SV – III e, depois das proteínas menores SV – IV e SV – V, incorporando-se ao coágulo. As maiores proteínas que formam o coágulo no sêmen humano são Sg I e II que correspondem no rato às proteínas da vesícula seminal, que são substratos para o TG4 (METAFORA et al., 2007). Nos ratos, o plugue copulatório formado pela secreção da vesícula seminal e da glândula de coagulação tem papel fundamental no transporte de esperma transcervical e na potencialização da fertilidade, pois impede a saída dos espermatozóides da genitália feminina após o coito (CARBALLADA & ESPONDA, 1992; CARVALHO et al., 2003).

## **1.6 Estresse**

O estresse é o principal agente de várias psicopatologias. Embora, a resposta orgânica aos efeitos do estresse desencadeie diferentes suscetibilidades, seu mecanismo de ação através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é bem estudado. Após uma situação estressante, ocorre a liberação de glicocorticóides e catecolaminas através da ativação do eixo HHA que prejudica a homeostase do organismo e, em especial, da função reprodutiva pelo fato de utilizar o mesmo eixo (NEWPORT et al., 2002).

Pesquisas sobre alcoolismo enfatizam que 60% da suscetibilidade da dependência ao álcool é devido à variação genética e o restante a fatores ambientais (GODIS, 2000; WHITFIELD et al., 2004; WHITFIELD, 2005). Os fatores ambientais foram estudados em relação à prevalência do alcoolismo ou problemas relacionados ao consumo de álcool nos três principais estágios da vida: adulto (WHITFIELD et al., 2004; WHITFIELD, 2005), adolescente (RHEE et al., 2003; JACOB et al., 2003) e criança (LIEBERMAN, 2000; JACOB et al., 2003). Porém, pouco se sabe sobre a importância da relação materno-infantil frente ao consumo de álcool no período de desenvolvimento pós-natal e sua influência na vida adulta.

Existem fortes evidências de que eventos estressantes, durante o desenvolvimento precoce, contribuem significativamente para tornar o adulto vulnerável a psicopatologias. Os cuidados paternos contribuem para produzir respostas adaptativas a fatores estressantes, protegendo a criança das doenças. Porém, a privação da presença dos pais, especialmente materna, pode romper com essa proteção, bem como ser, por si só, fator estressante durante o início da vida e provocar conseqüências na vida adulta (DE BELLIS et al., 1999; NEWPORT et al., 2002).

Estudos experimentais que enfoquem os eventos ocorridos no ambiente pós-natal são de fundamental importância para o entendimento dos efeitos no organismo e no neurocomportamento. Constituem exemplos de abordagem interdisciplinar, considerando as interfaces entre as ciências biológicas, psicossociais e médicas (PRYCE & FELDON, 2003).

Experiências traumáticas na infância precoce estão associadas ao aumento do risco do abuso de álcool e substâncias químicas na adolescência e no adulto. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico em resposta ao estresse, incluindo prejuízo no desenvolvimento cerebral (DE BELLIS, 2002; ROMAN et al., 2004). Desse modo, traumas e negligências na infância exercem influências no comportamento emocional e riscos para o desenvolvimento de depressão, ansiedade e abuso de substâncias durante o crescimento (DUBE et al., 2001; JOHNSON et al., 2002).

Modelos animais, embora com limitações, são ferramentas importantes para a pesquisa psiquiátrica por oferecer certas vantagens em relação às pesquisas com seres humanos, além da questão ética. Experimentos com roedores têm-se mostrado modelo biológico adequado para testes de perfis de comportamento fisiológico e neuroendócrino, devido a fácil aquisição e manipulação, período gestacional breve que facilita o acompanhamento do desenvolvimento, permitem manipulações específicas e controladas do ambiente e medidas invasivas das atividades biológicas (NEWPORT et al., 2002). Estudos experimentais indicam que perturbações produzem impactos prejudiciais e persistentes no comportamento da prole durante período de cuidados maternos com a ninhada, além de promover evento estressante para a mãe e os filhotes. Fatores estressantes, incluindo separação materna, produzem no animal comportamento característico de ansiedade e de desordem afetiva. O estresse provocado induz a hiper-responsividade do eixo HHA, causando hipersecreção do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH). Segundo NEWPORT et al. (2002), esses resultados são notavelmente similares aos observados nas doenças relacionadas ao estresse em seres

humanos. Crianças que sofreram estresse durante a infância devido a alterações no comportamento dos pais demonstram alterações permanentes no comportamento (TEICHER, 2000).

As características de personalidade, a educação e a situação social estão relacionadas às alterações dos fatores estressantes, podendo ser agravadas pelo abuso do fumo, álcool e drogas. Pesquisas em animais e seres humanos sugerem que situações de estresse aumentam o consumo de etanol (SODERPALM & WIT, 2002). No entanto, quanto mais se utiliza álcool para aliviar situações de estresse, menos efeito ele produz, necessitando de maiores doses para se obter o efeito de relaxamento desejado, entrando num ciclo vicioso de causa e efeito (PUPITZ-FILHO, 1987; SAN JOSÉ et al., 2000; OBERLEY, 2002).

A relação mãe-filhote é intensa, a mãe é a fonte de alimento, fornece estímulos térmicos, somatossensoriais, olfatórios, visuais e auditivos que auxiliam no desenvolvimento pós-natal da prole. No entanto, fatores ambientais que possam provocar modificações nessa relação, tanto em animais quanto em humanos, influenciarão o neurocomportamento e a biologia da prole por toda a vida (DE BELLIS et al., 1999; TEICHER, 2000; PRYCE & FELDON, 2003).

LEVINE, há mais de 50 anos, desenvolve modelos de estimulação neonatal para estudo dos efeitos do estresse. Os primeiros estudos comparavam filhotes manipulados com filhotes sem manipulação humana. Posteriormente, críticas foram feitas sobre a artificialidade do grupo de animais de laboratório sem qualquer manipulação humana e do grupo estimulado manualmente, cuja manipulação tátil não representaria fator estressante, mas estimulador dos cuidados maternos, melhorando a resposta do filhote ao estresse (PRYCE et al., 2001; NEWPORT et al., 2002; PRYCE & FELDON, 2003).

O modelo de experimentação, inicialmente utilizado sobre efeito do estresse neonatal na vida adulta foi denominado de manipulação neonatal (EH – *early handling*). Nesse modelo, os filhotes de roedores são removidos diariamente de suas caixas e rapidamente manuseados (estímulo tátil) pelo pesquisador. No entanto, a expectativa desse modelo em aumentar a ansiedade e as respostas biológicas ao estresse por estimulações futuras não se concretizou. Observou-se que a estimulação neonatal produz diminuição dos comportamentos de ansiedade e das respostas biológicas ao estresse. Filhotes manipulados são resistentes ao estresse e à diminuição temporal da capacidade cognitiva, exibem alto nível de comportamento exploratório em ambientes novos e demonstram baixa resposta neuronal em relação ao estresse na vida adulta (PRYCE et al., 2001; NEWPORT et al.,

2002; PRYCE & FELDON, 2003). A manipulação neonatal diminui a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Estudos demonstraram respostas diminuídas do hormônio adrenocorticotrófico e da corticosterona após subseqüentes fatores estressantes. Manipulação neonatal também produz redução dos níveis circulantes basais do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona. Para NEWPORT et al. (2002), a manipulação neonatal constitui evento de variação ambiental que pode afetar a ontogênese dos sistemas biológicos. No entanto, não pode ser diretamente aplicada para o estudo do impacto do estresse referente aos cuidados maternos, visto que, a manipulação melhora a adaptabilidade do rato a subseqüentes estresses. Sugere-se que o filhote não considera a manipulação tátil estímulo nocivo, nem desconfortável. Outra observação é o aumento dos cuidados maternos à prole, causando benefícios à adaptabilidade do filhote.

Outro modelo utilizado denomina-se privação materna (*maternal deprivation* - MD ou *early deprivation* - ED). Nesse modelo, os filhotes são separados da mãe em intervalos superiores a uma hora, durante o desenvolvimento pós-natal, antes do desmame. Assim, os filhotes não só ficam privados dos cuidados maternos durante o período, que pode ser de até 24 horas, mas também sofrem pela alteração do comportamento materno aberrante, que persiste após a reunião mãe-filhotes. A privação materna induz alteração na atividade do eixo HHA, aumentando as concentrações séricas de ACTH e de corticosterona. São observadas diferentes alterações neurobiológicas conforme diferentes modelos de separação materna, contudo, quando a privação ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, verificou-se que os efeitos são persistentes (PRYCE et al., 2001; NEWPORT et al., 2002; PRYCE & FELDON, 2003; SCHMIDT et al., 2004).

Atualmente, busca-se melhorar o conhecimento das complexas inter-relações dos processos orgânicos relacionados ao estresse, do controle dos sistemas nervoso e endócrino e das funções reprodutivas e suas possíveis relações com outras psicopatologias. No entanto, sabe-se que o estresse pode suprimir a atividade do eixo reprodutivo, que os hormônios reprodutivos podem modular a atividade nervosa controladora das respostas orgânicas ao estresse e que indivíduos com depressão podem ter, tanto as funções reprodutivas quanto à resposta ao estresse, alterados (CAMERON 2004).

Exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo HHA e, concomitantemente, reduz a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) (YOUNG & KORSZUN, 2002; RETANA-MARQUEZ et al. 2003). Não há dúvidas, portanto, que estresses sociais e ambientais produzem efeitos prejudiciais na função reprodutiva (WINGFIELD & SAPOLSKY, 2003). No entanto, diferentes fatores



estressantes produzem diferentes efeitos reprodutivos, havendo diferença nas respostas a curto e longo prazo. Estresse de curta duração, muitas vezes, não acarreta alterações reprodutivas e há fatores considerados estressantes que são estimulantes. Também, observa-se especificidade dos efeitos do estresse na reprodução, considerando diferentes espécies e diferenças sexuais no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (TILBROOK et al., 2000; MOTZER & HERTIG, 2004).

O eixo HHA está normalmente quiescente durante o período hiporresponsivo ao estresse (SHRP), do 4º ao 14º dia pós-natal nos ratos. Nesse período, o rato neonato demonstra, aparentemente, pouca ou nenhuma resposta adrenocortical a estímulos estressores, que no adulto resultaria em aumento significativo das concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona (SMITH et al., 1997; YOSHIMURA et al., 2003; SCHMIDT et al., 2003). No entanto, a privação materna pode desinibir o eixo HHA, possibilitando ao rato neonato responder a fatores estressantes brandos. Essa experiência ambiental precoce (privação materna) pode conduzir a alterações permanentes da resposta ao estresse e ser fator significativo de risco de psicopatologias na vida adulta (SMITH et al., 1997; LEVINE, 2001; LEHMANN et al., 2002; SCHMIDT et al., 2004).

MAZARO (2003) demonstrou a importância do ambiente neonatal para o desenvolvimento posterior do aparelho reprodutor. Utilizando estimulação neonatal em ratos machos, observou efeitos prejudiciais prolongados em parâmetros reprodutivos na puberdade, como diminuição na quantidade de gametas no testículo e epidídimo. Também observou diminuição na concentração plasmática de LH, porém não nas concentrações de FSH e de testosterona.

ROMAN et al. (2004) verificou que o fator estressante da separação materna em ratos não alterou o consumo voluntário de etanol em fêmeas. Contudo, dados na literatura especializada são controversos a respeito de alterações do consumo voluntário de etanol e efeitos biológicos em ratos machos, submetidos à separação materna durante o desenvolvimento pós-natal. Sugere-se haver diferenças sexuais nas conseqüências comportamentais e biológicas da separação materna quando considerado o consumo voluntário de etanol.

## **1.7 Justificativa**

Várias alterações morfofisiológicas relacionadas à ingestão abusiva de etanol têm sido descritas no sistema genital masculino. Relatam-se problemas na queda da produção

de testosterona, o que acarreta a atrofia testicular, a redução do peso e atrofia epitelial das glândulas sexuais acessórias. Ultra-estruturalmente observam-se dilatação do retículo endoplasmático rugoso, alterações no complexo de Golgi, ruptura de crista mitocondrial, alterações na morfologia nuclear e acúmulo de gotículas lipídicas no citoplasma das células epiteliais (CÂNDIDO et al., 2007; MARTINEZ et al., 2007).

A etiologia e as disfunções demonstradas nas glândulas sexuais acessórias decorrentes do uso abusivo de etanol ainda não estão claras. Duas hipóteses têm sido estudadas: o etanol agindo diretamente no testículo e ovário provocando a atrofia gonadal, ou, o etanol agindo no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, interferindo na secreção de gonadotrofinas que levando a alterações no sistema genital masculino (MARTINEZ et al., 2007).

As linhagens de ratos bebedores voluntários de etanol, UChA e UChB, mantidas pelo grupo de pesquisa Biologia da Reprodução do IBB/UNESP representam um modelo experimental adequado na investigação de alterações morfofisiológicas em órgãos genitais.

Os trabalhos científicos desenvolvidos pelo Grupo com as linhagens de UChA e UChB (MARTINEZ et al., 2000, 2002; RISSATO et al., 2003), mostraram que as alterações morfofisiológicas observadas no sistema genital masculino são similares àquelas descritas nos modelos experimentais de separação materna e de manipulação neonatal. Dessa forma, despertou-se interesse em estudar a associação entre o estresse, representado pelo modelo da separação materna, e o etanol sobre os órgãos genitais masculinos de ratos bebedores voluntários de etanol. Reforçando esta hipótese pesa o fato de que muitos dos fatores observados no alcoólico podem ser frutos do estresse vivido precocemente podendo estar potencializados ou não no indivíduo adulto.

### **1.8 Objetivos gerais:**

- Investigar e avaliar se há interação entre a separação materna e o alcoolismo sobre a vesícula seminal e a glândula de coagulação em ratos UCh.

### **1.9 Objetivos específicos:**

- Analisar a estrutura e a morfometria do epitélio secretor da vesícula seminal e glândula de coagulação do rato adulto;
- Avaliar o índice da proliferação celular da vesícula seminal e glândula de coagulação do rato adulto;

- Avaliar o fenótipo do epitélio secretor através da imunomarcção da proteína p63 da vesícula seminal e glândula de coagulação do rato adulto;
- Avaliar a população de células que expressa o receptor de andrógeno através do método imuno-histoquímico na vesícula seminal e glândula de coagulação do rato adulto;
- Avaliar as concentrações plasmáticas de testosterona e corticosterona do rato adulto;

## II – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, R.A. Clinically important effects of alcohol on endocrine function. *Journal of Clinical of Endocrinology and Metabolism*, v. 74, p. 957-60, 1992.
- ALARID, E.T; RUBINO, J.S.; YONG, P.; CHEDID, M.; RON, D.; STUART, A.A.; CUNHA, G.R. Keratinocyte growth factor functions in epithelial induction during seminal vesicle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Cell Biology)*, v. 91, p. 1074-1078, 1994.
- BANNISTER, P.; LOSOWSKY, M.S. Ethanol and hypogonadism. *Alcohol*, v. 22, p. 213-217, 1987.
- BAUMBACH, J. Some Implications of Prenatal Alcohol Exposure for the Treatment of Adolescents With Sexual Offending Behaviors. *Sexual Abuse: A Journal of Research and Treatment*, v.14, n. 04, p. 313-327, 2002.
- BOSLAND, M. C.; TUOMARI, D. L.; ELWELL, M. R.; SHIRAI, T.; WARD, J.M.;MCCONNELL, R. F. Proliferative lesions of the prostatic and other accessory sex glands in male rats. *Guides for toxicology pathology*. Washington, DC: STP/ARP/AFIP. p. 01-20, 1998.
- BOYDEN, T.W.; PAMENTER, R.W. Effects of ethanol on the male hypothalamic-pituitary-gonadas axis. *Endocr. Rev.*, v. 04, n. 04, p. 389-395, 1983.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Assistência e Promoção à Saúde. Coordenação de Saúde Mental. Serviço de Atenção ao Alcoolismo e Drogadição. *Normas e procedimentos na abordagem do alcoolismo*. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1994, 61p.
- BUFFUM, P. Pharmacosexology the effects of drug on sexual function: a review. *J. Psychoactive drugs*, v.14, p. 05-44, 1983.
- CACIANO, R.; CASSANO, T.; COLUCCIA, A.; GAETANI, S.; GIUSTINO, A.; STEARDO, L.; TATTOLI, M.; TRABACE, L.; CUOMO, V. Genetic Factors Involved in the Effects of Developmental Low-Level Alcohol Induced Behavioral Alterations in Rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 26, p. 191–203, 1998.
- CABALLERÍA, J. Current concepts in alcohol metabolism. *Ann. Hepatol.*, v. 02, n. 02, p. 60-68, 2003.
- CAGNON, V.H.A.; GARCIA, P.J.; MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, CR. Ultrastructural study of the coagulating gland of wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *The prostate*. v. 28, p. 341-346, 1996.

- CAMERON, J. L. Interrelationships between hormones, behavior, and affect during adolescence: complex relationships exist between reproductive hormones, stress-related hormones, and the activity of neural systems that regulate behavioral affect. Comments on part III. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1021, p. 134-142, 2004.
- CÂNDIDO, E.M.; CARVALHO, C.A.F.; MARTINEZ, F.E.; CAGNON, V.H.A. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biology International*, v. 31, p. 459-472, 2007.
- CARBALLADA, R., ESPONDA, P. Role of fluid from seminal-vesicles and coagulating glands in sperm transport into the uterus and fertility in rats. *J. Reprod. Fertil.*, v.95, p.639-648, 1992.
- CARVALHO, C.A.F.; CAMARGO, A.M.; CAGNON, V.H.A.; PADOVANI, C.R. Effects of Experimental Diabetes on the Structure and Ultrastructure of the Coagulating Gland of C57BL/6J and NOD Mice. *THE ANATOMICAL RECODS PART A*, v. 270A, p. 129-136, 2003.
- CAVAZOS, F. Fine structure and functional correlates of male accessory sex glands of rodents. In: Greep RO, Astwood EB, editors. *Handbook of Physiology. American Physiological Society*, p. 353-381, 1975.
- CHOW, P.H., PANG, S.F. Ultrastructure of secretory cells of male accessory sex glands of Golden Hamster *Mesocricetus auratus* and effect of Melatonin. *Acta Anat.(Basel)*, 1989; v. 134, n. 04, p. 327-340, 1989.
- CLAIR, H.R.S. *Recognizing alcoholism and its effects: a mine-guide*. Basel: S. Karger, 1991, 105p.
- CLAVERT, A.; CRANZ, C.; BOLLACK, C. *Functions of the seminal vesicle*. Centre d'Etude et de Conservation des Oeufus et du Sperme Humains, Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur, Strasbourg/France; Servive d'Urologic CHRU. Strasbourg/France. p. 185-192, 1990.
- CUNHA, G.R.; ALARID, E.T.; TURNER, T.; DONJACOUR, A.A.; BOUTIN, E.L.; FOSTER, B.A. Normal and Abnormal Development of the Male Urogenital Tract: Role of Androgens, Mesenchymal-Epithelial Interactions, and Growth Factors. *Journal of Andrology*, v. 13, n. 06, p. 465-475, 1992.
- CUNHA, G.R.; DANJACOUR, A.A.; COOKE, P.S.; MEE, S.; BIGSBY, R.M.; HOGGINS, S.J.; SUGIMURA, Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.*, v. 08, p. 338-362, 1987.

- CUNHA, G.R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; MARKER, P.C.; RISBRIDGER, G.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z.; DONJACOUR, A.A.; KURITA, T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 92, p. 221-236, 2004.
- DAHL, E.; KJAERHEIM, A.; TVETER, K.J. The ultrastructure of the accessory sex organs on the male rat. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.*, v. 137, n. 03, p. 345-359, 1973.
- DE BELLIS, M.D.; KESHAVAN, M.S.; CLARK, D.B.; CASEY, B.J.; GIEDD, J.N.; BORING, A.M.; FRUSTACI, K.; RYAN, N.D. A. E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part II: brain development. *Biology Psychiatry*, v. 45, p. 1235-1236, 1999.
- DOHLE, G.R.; SMIT, E.M.; WEBER, E.R.F.A. Androgens and male fertility. *World J. Urol.*, v. 21, p. 341-345, 2003.
- DUBE, S.R.; ANDA, R.F.; FELITTI, V.J.; CROFT, J.B.; EDWARDS, V.J.; GILES, W.H. Growing up with parental alcohol abuse: exposure to childhood abuse, neglect, and household dysfunction. *Child Abuse Negl.*, v. 25, n. 12, p. 1627-1640, 2001.
- FÁVARO, W.J.; CAGNON, V.H.A. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue and Cell*, v. 38, p. 311-323, 2006.
- FORTES, J.R.A. *Alcoolismo*. São Paulo: Sarvier, 1975. 327p.
- FORTES, J.R.A.; CARDO, W.N. *Alcoolismo*. São Paulo: Sarvier, p. 17-19, 1991.
- FOSTER, B.A.; CUNHA, G.R. Efficacy of various natural and synthetic androgens to induce ductal branching morphogenesis in the developing anterior rat prostate. *Endocrinology*, v. 140. n. 01, p. 318-328, 2008.
- GEOKAS, M.C.; LIEBER, C.S.; FRENCH, S.; HALDSTED, C.H. Ethanol, the liver, and the gastrointestinal tract. *Ann. Int. Med.*, v. 95, p. 198-211, 1981.
- GIACHETI, L.M. Cresce o número de mulheres alcoólatras. *Jornal da Cidade*, Bauru, 01 dez, p.14, 1996.
- GODIS, E. Contributions of behavioral science to alcohol research: understanding who is at risk and why. *Exp. Clin. Psychopharmacol.*, v. 08, n. 03, p. 264-270, 2000.
- GOMES, I.C.; CAGNON, V.H.A.; CARVALHO, C.A.F.; DE LUCA, I.M.S. Stereology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. *Tissue & Cell*, v. 34, p. 177-186, 2002.
- GONZALES, G.F. Functional structure and ultrastructure of seminal vesicles. *Archives of Andrology*, v. 22, p. 01-13, 1989.

- GUDE, W. D.; COSGROVE, G. E.; HIRSCH, G. P. *Histological atlas of the laboratory mouse*. New York: Plenum Press, p. 16-79, 1982.
- HAYWARD, S.W.; BASKIN, L.S.; HAUGHNEY, P.C.; FOSTER, B.A.; CUNHA, A.R.; DAHIYA, R.; PRINS, G.S.; CUNHA, G.R. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat.*, v. 155, p. 94-403, 1996.
- HEBEL, R.; STROMBERG, M. V. *Anatomy and embriology of the laboratory rat*. Wörthensee: BioMed Verlag, p. 270, 1986.
- HIRATA, E.S.; HIRATA, L.C.M. Bioquímica e metabolismo do etanol. In: FORTES, J.R.A.; CARDO, W.N. *Alcoolismo: diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Sarvier, p. 57-64, 1991.
- JACOB, T.; WATERMAN, B.; HEALTH, A.; TRUE, W.; BUCHOLZ, K.K.; HABER, R.; SCHERRER, J.; FU, Q. Genetic and enviromental effects on offspring alcoholism: new insights using an offspring-of-twins design. *Arch. Gen. Psychiatry*. v. 60, n. 12, p. 1265-1272, 2003.
- JOHNSON, V.; CLARK, T.; FLEMING, J.W. Parental views of the development of children in a rural South African community. *ABNF J.* v. 13, n. 01, p. 18-22, 2002.
- KALANT, H. Absortion, diffusion, distribution and elimination of Ethanol: effects on biological menbranes. *Biol. Alcohol. Biochem.*, v. 01, p. 01-62, 1983.
- KIM, J.H.; KIM, H.J.; NOH, H.S.; ROH, G.S.; KANG, S.S.; CHO, G.J.; PARK, S.K.; LEE, B.J.; CHOI, W.S. S uppression by ethanol of male reproductive activity. *Brain Research*, v. 989, p. 91-98, 2003.
- KORSTEN, M.A.; LIEBER, C. Nutrição no alcoólico. *Med. Clin. N. Am.*, Lawrence, v. 63, p. 672-963, 1979.
- LAMIRANDE, E. Semenogelin, the Main Protein of the Human Semen Coagulum, Regulates Sperm Function. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS*, v. 33, n. 01, 2007.
- LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C.; MARQUES, A.C. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. *Rev. Bras. Pediatr.*, v. 22, n. 02, p. 62-71, 2000.
- LARANJEIRA, R. (coord). *Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento*. 2. ed. São Paulo: Conselho Regional de Medicina de São Paulo/Associação Médica Brasileira, 2003. 120p.

- LEHMANN, J.; RUSSIG, H.; FELDON, J.; PRYCE, C.R. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, v. 73, p. 141-145, 2002.
- LEVINE, S. Primary social relationship influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.*, v. 73, p. 255-260, 2001.
- LI, T.K.; SPANAGEL, R.; COLOMBO, G.; MCBRIDE, W.J.; PORRINO, L.J.; SUZUKI, T.; RODD-HENRICKS, Z.A. Alcohol reinforcement and voluntary ethanol consumption. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 25, n. 05, p. 117-126, 2001.
- LIEBERMAM, D.Z. Children of alcoholics: an update. *Curr. Opin. Pediatr.*, v. 54, p. 976-982, 2000.
- LIMA, J.M.B. Da necessidade de uma nova abordagem – parte II. *Rev. Bras. Neurol.*, v. 33, p.171-172, 1997.
- MARDONES, J., SEGOVIA-RIQUELME, N. Thirty-Two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav. Toxicol. and Teratol.*, v. 05, n. 05, p. 171-178, 1983.
- MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J.; PADOVANI, C.R.; CAGNON, V.H.A. Estudo morfológico da próstata e vesículas seminais de rato (*Rattus norvegicus*) durante o desenvolvimento pós-natal. *Salusvita*, v. 11, n. 01, p. 39-50, 1992.
- MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M.; GARCIA, P.J.; CAGNON, V.H.<sup>a</sup>; GRALHOZ, G.; SANTOS, C.X.C. Morfologia da vesícula seminal de chinchila (*Chinchila laniger*). *Rev. Ciênc. Biomed.*, v. 16, p. 17-23, 1995.
- MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; BUSTOS-OBREGON, E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 32, p. 175-84, 2000.
- MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M.; QUITETE, V.H.A.C.; MELLO JR.W.; PADOVANI, C.R. Alcoolismo, Reprodução e Genética. *Veterinária Notícias*, v. 08, n. 02, p. 121-30, 2002.
- MARTINEZ, M.; REIS, G.S.; PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D., CAGNON, V.H.A.; MELLO-JUNIOR, W.; PEREIRA, S.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Evaluation of the ethanol intake on the *Calomys callosus* seminal vesicle structure. *Micron*, 2007.



- MAZARO, R. *Efeitos da estimulação neonatal e do estresse peripuberal sobre parâmetros reprodutivos de ratos machos púberes*. Ribeirão Preto, 2003. 89p. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- METAFORA, S.; ESPOSITO, C.; CAPUTO, I.; LEPRETTI, M.; CASSESE, D.; DICITORE, A.; FERRANTI, P.; STIUSO, P. Seminal Vesicle Protein IV and Its Derived Active Peptides: A Possible Physiological Role in Seminal Clotting. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS*, v. 33, n. 01, 2007.
- MONOSKI, M.; NUDELL, D.M.; LIPSHULTZ, L.I. Effects of medical therapy, alcohol, and smoking on male fertility. *Contemporary Urology*, p. 57-63, 2002.
- MOTZER, S.A.; HERTIG, V. Stress, stress and health. *Nursing Clinics of North America*, v.39, p. 01-17, 2004.
- NEWPORT, D.J.; STOWE, Z.N.; NEMEROFF, C.B. Parental depression: animal models of an adverse live event. *Am. J. Psychiatry*, v.159, n. 08, p.1265-83, 2002.
- OBERLEY, T.D. Oxidative damage and cancer. *American Journal of Patology*. v. 02, p. 160, 2002.
- OLIVA, S.U.; MESSIAS, A.G.; SILVA, D.A.F.; PEREIRA, O.C.M.; GERARDIN, D.C.C.; KEMPINAS, W.G. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reproductive Toxicology*, v. 22, p. 599-605, 2006.
- PALMER, T.M. The biochemistry of alcohol and alcohol abuse. *Sci. Prog. (Oxf.)*, v. 73, p. 01-15, 1989.
- PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer Inst. Monogr.*, v.12, p.1-27, 1963.
- PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Inc. Dev Psychobiol*, v. 38, p. 239-251, 2001.
- PRYCE, C. R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, p. 57-71, 2003.
- PUROHIT, V. Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. *Alcohol*, v. 22, n. 03, p. 123-127, 2000.
- PURPITZ-FILHO, J. *Análise Transacional do Alcoólico*. Florianópolis: s.ed., p. 11-35, 1987.
- QUINTANILLA, M.E.; TAMPIER, L. Acetaldehyde Metabolism by Brain Mitochondria From UChA and UChB Rats. *Alcohol*, v. 12, n. 06, p. 519-524, 1995.

- QUINTANILLA, M.E.; CALLEJAS, O.; TAMPIER, L. Differences in sensitivity to the aversive effects of ethanol in low-alcohol drinking (UChA) and high-alcohol drinking (UChB) rats. *Alcohol*, v. 23, p. 177-182, 2001.
- QUINTANILLA, M.E.; ISRAEL, Y.; SAPAG, A.; TAMPIER, L. The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addiction Biology*, v. 11, p. 193-403. 2006.
- RAMOS, S.P.; BERTOLOTE, J.M. *Alcoolismo Hoje*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 240p.
- RETANA-MÁRQUEZ S.; BONILLA-JAIME H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTÍNEZ-GARCÍA R.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones & Behavior*, v. 44, n. 04, p. 327-337, 2003.
- RHEE, S.H.; HEWITT, J.K.; YOUNG, S.E., CORLEY, R.P.; CROWLEY, T.J.; STALLINGS, M.C. Genetics and environmental influences on substance initiation use, and problem use in adolescents. *Arch. Gen. Psychiatry*, v. 60, n. 12, p. 1256-1264, 2003.
- RISSATO, RISSATO, J.H., MARJORIE V. IETSUGU, M.V., ALMEIDA, C.C.D.A., PINHEIRO, P.F.F., SEGATELLI, T.M., MARTINEZ, M., PADOVANI, C.R., JÚNIOR, W.M., QUITETE, V.H.A.C., MARTINEZ, F.E. Morphology of the vas deferens in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.35, p.331-341, 2003.
- ROMAN, E.; GUSTAFSSON, L.; HYYTIÄ, P.; NYLANDER, I. Short and prolonged periods of maternal separation and voluntary ethanol intake in male and female ethanol-prefering AA and ethanol-avoiding ANA rats. *Alcohol*, v. 29, p. 541-601, 2005.
- ROBERTSON, S.A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.*, v. 322, p. 43-52, 2005.
- ROY-BURMAN, P.; WU, H.; POWELL, W.C.; COHEN, M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrine-Related Cancer*, v. 11, p. 225-254, 2004.
- SAN JOSÉ, B.; VAN OERS, H.A.M.; VAN DE MHEEN, D.; GARRETSEN, H.F.L.; MACKENBACH, J.P. Stressors and Alcohol consumption. *Alcohol & alcoholism*, v. 35. p. 307-312, 2000.

- SCHMIDT, M.; ENTHOVEN, L.; VAN DER MARK, M.; LEVINE, S.; DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S. The postnatal development of the hypothalamic-adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v.21, p. 125-32, 2003.
- SCHMIDT, M.; ENTHOVEN, L.; VAN WOEZIK, J.H.; LEVINE, S.; DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 16, p. 52-57, 2004.
- SMITH, M.A.; KIM, S.; VAN OERS, H.J.J.; LEVINE, S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*, v.138, p. 4622-4628, 1997.
- SODERPALM, A.H.; WIT, H. Effects of stress and alcohol on subjective state in humans. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 26, n. 06, p. 818-826, 2002.
- SOUZA, F. Proteínas do sêmen do cão são importantes ou não na fertilização? *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, n. 01, p. 108-114, 2007.
- SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health*, v.24, n. 02, p. 124-131, 2000.
- STOCKHOLM, N.I.S. An experimental and comparative study of its anatomical and functional organization in some mammals, including the presence of adrenaline and chromaffin cells in these organs. *Acta Physiologica Scandinavica*. v. 65, supp. 257, p. 13-22, 1965.
- SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A.; BISGBY, R.M.; BRODY, J.R. Whole-mount autoradiography study of DNA synthetic activity during postnatal development and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biology of Reproduction*, v. 34, p. 985-995, 1986.
- SUZUKI, K.; KISE, H.; NISHIOLA, J.; HAYASHI, T. The Interaction among Protein C Inhibitor, Prostate-Specific Antigen, and the Semenogelin System. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS*, v. 33, n. 01, 2007.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; MARDONES, J. Acute tolerance, alcohol sensitivity and drinking pattern in the F2 generation of UchA and UchB rats. *Journal of Studies on Alcohol*, v. 61, n. 05, p. 647-651. 2000.
- TEICHER, M. H. Wounds that time won't heal: the neurobiology of child abuse. *Martin H. Teicher in Cerebrum – Dana Press*, v. 02, p. 50-67, 2000.
- THOMSON, A.A.; MARKER, P.C. Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *Differentiation*, v. 74, p. 382-392, 2006.

- TILBROOK, A. J.; TURNER, A.I.; CLARKE, I.J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction*, v. 05, p. 105-13, 2000.
- VILLERS, A.; STEG,A.; BOCCON-GIBOD, L. Anatomy of the prostate review of the different models. *Eur. Urol.*, v. 20, p. 261-268, 1991.
- WANG, Y.; HAYWARD, S.; CAO, M.; THAYER, K.; CUNHA, G.R. Cell Differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, v. 68, p. 270-279, 2001.
- WHITFIELD, J.B.; ZHU, G.; MADDEN, P.A.; NEALE, M.C.; HEATH, A.C.; MARTIN, N.G. The genetics of alcohol intake and of alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 28, n. 08, p. 1153-1160, 2004.
- WHITFIELD, J.B. Alcohol and gene interations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v. 43, n. 05, p. 480-487, 2005.
- WINGFIELD, J.C.; SAPOLSKY, R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinology*, v. 15, p. 711-24, 2003.
- YOSHIMURA, S.; SAKAMOTO, S.; KUDO, H.; SASSA, S.; KUMAI, A.; OKAMOTO, R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*, v. 68, p. 439-445, 2003.
- YOUNG, E. A.; KORSZUN, A. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in mood disorders. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, v. 31, n. 01, p. 63-78, 2002.

### III – ARTIGO

Este trabalho deu origem ao artigo intitulado: **Há interação do etanol e separação materna sobre o epitélio secretor da vesícula seminal e glândula de coagulação de ratos UCh?** Após versão em inglês, será submetido para a publicação no periódico *Biology of Reproduction*.

## **Há interação do etanol e da separação materna sobre o epitélio secretor da vesícula seminal e glândula de coagulação de ratos UCh?**

*Correspondence to Fabiana Marconsini – Department of Anatomy, Biosciences Institute, UNESP, Campus of Botucatu – District of Rubião Junior s/n, Botucatu-SP, Brazil, Post Code: 18618-000, P. O. Box: 510 – Phone (+5502114) 3811-6040 – FAX (+5502114) 3811-6361  
e-mail: marconsini@ibb.unesp.br*

### **RESUMO**

Experiências adversas na infância estão associadas ao abuso de drogas como o álcool na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse. A exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e, reduz a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG). Pouco é conhecido sobre a complexa relação entre o estresse, o alcoolismo e as alterações das glândulas sexuais acessórias, fundamentais no processo reprodutivo. Considerando as linhagens de ratos UCh (bebedores voluntários de etanol), o conhecimento das alterações dos eixos HHG e HHA pelo alcoolismo e estresse, despertou-se interesse na investigação das interações entre o consumo de etanol e o estresse neonatal sobre a vesícula seminal e glândula de coagulação. Dessa forma, o presente trabalho propõe investigar e avaliar se há interação entre a separação materna e a ingestão de etanol sobre o epitélio da vesícula seminal e glândula de coagulação de ratos UCh. Metodologia: análise morfométrica das alturas dos epitélios, do índice de proliferação celular, da expressão da proteína p63 e do receptor de andrógeno e avaliação hormonal das concentrações plasmáticas de testosterona e corticosterona. A separação materna e a ingestão de etanol alteram o epitélio da vesícula seminal e glândula de coagulação e as concentrações plasmáticas de testosterona e corticosterona. Portanto há interação entre a separação materna e a ingestão de etanol sobre o epitélio da vesícula seminal e glândula de coagulação, possivelmente atuando sobre os eixos HHG e HHA, podendo levar a potencialização das alterações sobre a reprodução.

Palavras-chaves: etanol, separação materna, vesícula seminal, glândula de coagulação, ratos UCh.

## INTRODUÇÃO

Os cuidados maternos fornecem sinais e estímulos (térmicos, somatossensórios, nutricionais, olfatórios, visuais e auditivos) para o adequado desenvolvimento e crescimento durante a infância e contribuem para produzir respostas adaptativas a fatores estressantes. Porém, a privação da presença dos pais, especialmente a materna, pode romper com essa proteção e ser fator estressante durante o início da vida [1]. Estudos clínicos e experimentais mostram que experiências adversas na infância, como abusos, negligências emocionais e morte dos pais, podem expressar seus efeitos e alterações no desenvolvimento e maturação das funções dos órgãos na idade adulta [2].

A separação materna (SM) consiste de interrupções diárias dos cuidados maternos por período prolongado (>1h). Ratos submetidos a SM têm manifestado na vida adulta aumento do comportamento de ansiedade e hiper-reatividade permanente do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em resposta a estímulos estressores [3, 1]. O etanol, como estímulo estressor, é agente tóxico e perturbador da integridade das funções fisiológicas, bioquímicas e no desenvolvimento de estruturas orgânicas envolvidas na reprodução [4, 5, 6] e interfere na integridade dos eixos hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) e HHA [7]. Alterações nos diferentes níveis do eixo HHG podem manifestar-se no alcoólico crônico como: atrofia testicular, das glândulas sexuais acessórias, danos celulares ao epitélio dos órgãos genitais internos e esterilidade [8].

As alterações do sistema genital frente ao etanol e a SM são semelhantes [9, 10, 11, 12]. Existem mecanismos de respostas semelhantes a drogas (etanol) e ao estresse (SM), possibilitando alterações dos órgãos do sistema genital interno similares, independentemente da ação de uma droga ou de um modelo de agente estressor? Essa é a pergunta fundamental que poderá trazer evidências de respostas semelhantes dos sistemas biológicos a diferentes formas de perturbação do meio ambiente ou de nossa homeostase. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar se há interação do etanol com a separação materna sobre o epitélio da vesícula seminal e glândula de coagulação de ratos UCh adultos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais*

Os ratos das linhagens UChA (bebedores voluntários de baixa quantidade de etanol) e UChB (bebedores voluntários de alta quantidade de etanol) foram provenientes

do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu (IBB/UNESP) e os ratos Wistar foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, São Paulo, Brasil. Doze casais de cada linhagem (UChA, UChB e Wistar) foram formados e, em cada linhagem, dois grupos experimentais (Controle - CO e Separação Materna - SM). No dia do nascimento, dia zero, cada ninhada foi padronizada com oito filhotes, selecionando o maior número de machos possíveis. Cada grupo utilizou quatorze animais durante 120 dias de experimentação. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno medindo 40X30X15cm com fundos sólidos, forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro), temperatura (20 à 25°C) com água filtrada e ração (Nuvital<sup>®</sup>) *ad libitum*. O protocolo experimental, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IBB/UNESP, seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### *Indução de hiperatividade ao estresse por Separação Materna (SM)*

Os filhotes das ninhadas dos grupos SM foram separados da mãe diariamente, durante o Período Hiporresponsivo ao Estresse (*stress-hyporesponsive period* - SHRP), do 4º ao 14º dia de idade, sempre no mesmo horário. Os filhotes foram individualizados em caixas com oito subdivisões, uma para cada filhote, durante 4h. Os filhotes foram acomodados em sala anexa com temperatura de 30°C e umidade superior a 50%. Posteriormente, foram devolvidos aos cuidados da mãe, retirando-se a mãe de sua caixa antes de retornar a prole. Os filhotes dos grupos controles não foram separados da mãe, recebendo os cuidados de manejo para criação de animais de laboratório. Os animais foram manejados por único pesquisador do início ao fim da experimentação. As mãos do investigador foram lavadas em água corrente, secas e esfregadas na maravalha do forro das caixas da ninhada, eliminando os odores que pudessem levar a rejeição da mãe à prole. A sala de experimentação foi mantida isolada de ruídos externos. Os filhotes machos foram alojados em caixas com o mínimo de dois e o máximo de quatro animais, após o desmame aos 21 dias, evitando o estresse pelo isolamento social. Foram individualizados e receberam manejo regular para a espécie aos 50 dias de idade.

#### *Seleção dos animais bebedores de etanol*

Os ratos UChA e UChB receberam água *ad libitum* e solução de etanol a 10% aos 65 dias de idade durante o período de 15 dias, alternando as posições das garrafas (água e



etanol) na caixa durante as mensurações. Os animais da linhagem UChB, com maior consumo de etanol foram selecionados (n=14), e os UChA, selecionados os de menor consumo de etanol (n=14). A administração de etanol a 10% aos ratos UCh, juntamente com provimento de água, ambos *ad libitum*, permaneceu até o final do experimento (120 dias). O consumo de etanol foi mensurado em intervalos de quatro dias. A seleção e padronização das linhagens UChA e UChB foram realizadas com quatorze animais de cada grupo [13]. O mesmo número de animais foi selecionado na linhagem Wistar ao acaso.

#### *Coleta de materiais biológicos*

A coleta dos materiais biológicos foi realizada aos 120 dias de idade de acordo com dois procedimentos distintos: a) sete animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para avaliação das concentrações hormonais plasmáticas do sangue; b) sete animais foram submetidos à perfusão transventricular com solução fixadora de Bouin após anestesia. As vesículas seminais e as glândulas de coagulação foram dissecadas, coletadas, fixadas em Bouin por 24h, lavadas em álcool 70%, desidratadas, diafanizadas, incluídas em paraplástico e cortadas com quatro micrômetros de espessura. Os cortes transversais foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TMa). As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio AXIOPHOT-II com câmera digital, modelo AxioCam HR, Zeiss<sup>®</sup>, do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

#### *Avaliação morfológica*

##### *Análise da altura do epitélio secretor*

As lâminas histológicas coradas com HE foram utilizadas na mensuração das alturas dos epitélios secretores da vesícula seminal e da glândula de coagulação. Foram utilizadas três lâminas por animal, totalizando 10 secções transversais ao acaso das três lâminas, sendo obtidas duas medidas da altura por secção. As variáveis descritas foram analisadas através do programa de análise de imagens Axiovision, Zeiss<sup>®</sup>, do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

#### *Avaliação imuno-histoquímica*

As análises imuno-histoquímicas foram restritas ao epitélio da vesícula seminal e glândula de coagulação. Do material fixado com solução de Bouin e incluído em paraplástico, foram obtidas coleções de lâminas com cortes de 4µm de espessura. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol e álcool e

lavados em solução de tampão fosfato de sódio (PBS), 0,1M e pH 7,4. Para a recuperação da atividade antigênica, as lâminas foram colocadas em solução de tampão citrato de sódio a 0,01M, pH 6,0 e levadas ao forno de microondas a 700-800W, durante 15 minutos, divididos em três ciclos (15', 10' e 5'). A cada ciclo completou-se a cuba de lâminas com a solução tampão e depois se lavou com tampão PBS. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram colocadas em solução de peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 3% em álcool metílico (metanol) durante 15 minutos no escuro e lavadas com tampão PBS. Na etapa seguinte, as secções foram submetidas à solução de leite desnatado em pó a 2% em tampão PBS durante 60 minutos para o bloqueio de reações inespecíficas. A seguir, as lâminas foram submetidas à reação com os anticorpos contra a proteína p63 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Tabela 1) e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C em geladeira. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS e durante 1h, à temperatura ambiente, as secções foram incubadas com anticorpo secundário. Após, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas à solução de estrepto-avidina-biotina-peroxidase (*StreptABComplex DAKO<sup>®</sup> CYT*) por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e submetidas à diaminobenzidina (DAB) (di-aminobenzidine-Sigma<sup>®</sup>) por 5 minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e contrastadas com Hematoxilina.

Para investigação do receptor de andrógeno (AR), as secções foram processadas usando o método de estrepto-avidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização, as secções foram hidratadas em série alcoólicas e para exposição e recuperação do antígeno foram incubadas em tampão citrato 0,01M, pH 6,0 e Tris-EDTA, pH 9,0 em panela de pressão por 2 minutos. A inibição da peroxidase endógena foi obtida através de solução de peróxido de hidrogênio a 3% em tampão salino Tris (TBS) por 20 minutos. Após lavagem em TBS, o bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com soro de burro normal a 3%, diluído em tampão TBS e Triton X-100 0,05% por uma hora. Posteriormente, a incubação com anticorpo primário (Tab. 1), diluído em solução bloqueio (diluída 1:10 em TBS), foi realizada a 4°C durante a noite. Após lavagem em TBS, o anticorpo secundário biotinizado de camundongo anti-coelho (Dako, Glostrup, Dinamarca) na diluição 1:500 em solução bloqueio 1:9, foi incubado por 1h. Após lavar em TBS, as secções foram incubadas com a solução de estrepto-avidina-biotina-peroxidase (*StreptABComplex/HRP* da Dako) por 45 minutos e reveladas com diaminobenzidina (DAB), usando método de intensificação com glicose oxidase-diaminobenzidina-níquel.

Durante a realização da técnica foram obtidos controles negativos para avaliar a especificidade da imunoreação. Os controles negativos não receberam anticorpo primário evitando marcações inespecíficas. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio AXIOPHOT-II com câmera digital, modelo AxioCam HR, Zeiss®, do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

#### *Análise da população de células epiteliais submetidas às reações imuno-histoquímicas*

Para quantificação das células positivas, foram analisados campos aleatórios de cortes transversais da vesícula seminal e da glândula de coagulação, contando-se o número de células positivas para cada antígeno pesquisado em 1000 células epiteliais por animal.

#### *Dosagens hormonais*

Amostras de sangue de sete animais de cada grupo foram coletadas após decapitação. As concentrações de testosterona e corticosterona no plasma sanguíneo foram determinadas por rádio-imuno-ensaio de duplo anticorpo, utilizando conjunto de reagentes obtidos do *National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA, USA)*. Os ensaios foram realizados no Laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

#### *Análise estatística*

O estudo estatístico das variáveis foi realizado através da técnica de ANOVA para o modelo com dois fatores e complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey e de Dunn para contraste entre médias e/ou medianas dos tratamentos. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão ou mediana e valores mínimo e máximo. Os resultados foram apresentados em tabelas, sendo todas as conclusões estatísticas realizadas com 5% de significância [14].

## **RESULTADOS**

#### *Massa da vesícula seminal e glândula de coagulação*

Não houve interação do etanol com a separação materna sobre a massa da vesícula seminal e da glândula de coagulação dos ratos UCh e Wistar (Tab. 2).

#### *Descrição fenotípica dos epitélios secretores da vesícula seminal e da glândula de coagulação*

A expressão da proteína p63 foi restrita ao compartimento basal dos epitélios da vesícula seminal e glândula de coagulação, permitindo identificar os dois compartimentos basal e secretor. As células basais apresentaram marcação uniforme e forte, evidenciando núcleos poligonais e centrais (Figs. 1A e B).

As células secretoras da glândula de coagulação (Figs. 2A e B) e as células principais da vesícula seminal (Figs. 1C, D, E e F) foram marcadas pelo do receptor de andrógeno. As células secretoras e principais apresentaram núcleos basais, sendo maiores e mais numerosas que as basais.

Na expressão do PCNA observou-se aumento da proliferação celular na vesícula seminal (Fig. 3) e glândula de coagulação (Figs. 2C e D) do grupo UChB-SM.

#### *Análise morfométrica da altura do epitélio secretor da vesícula seminal e da glândula de coagulação*

Houve interação do etanol com a separação materna sobre a altura do epitélio da vesícula seminal dos ratos UCh. A interação foi positiva, pois houve potencialização da redução da altura do epitélio da vesícula seminal dos ratos UCh e Wistar pela SM. Os grupos UCh (CO e SM) apresentam menor altura do epitélio secretor da vesícula seminal quando comparados ao grupo Wistar (CO e SM). Em todos os grupos a condição experimental SM apresentou menor altura do epitélio secretor da vesícula seminal quando comparado aos grupos CO (Tab. 3).

Houve interação do etanol com a separação materna sobre a altura do epitélio da glândula de coagulação dos ratos UCh. A interação foi positiva, pois houve potencialização da redução da altura do epitélio da glândula de coagulação dos ratos UCh. Em todos os grupos, a condição experimental SM apresentou menor altura do epitélio secretor da glândula de coagulação quando comparados aos seus controles (Tab. 4).

#### *Avaliação quantitativa da proliferação celular, da expressão da p63 e do AR nuclear*

Houve interação do etanol com a separação materna sobre a expressão da p63, do AR e da proliferação celular (PCNA) no epitélio da vesícula seminal dos ratos UCh. O grupo Wistar CO apresentou maior número de células positivas para p63 do que a condição experimental SM e os outros grupos UChA (CO e SM) e UChB (CO e SM). Quanto ao PCNA, os grupos Wistar CO e UChB SM apresentaram maior número de células positivas. O grupo Wistar (CO e SM) apresentou maior número de células positivas para o AR (Tab. 5).

Houve interação do etanol com a separação materna sobre a expressão do AR e da proliferação celular (PCNA) no epitélio da glândula de coagulação dos ratos UCh. O grupo UChB SM apresentou maior número de células positivas para o PCNA do que seu controle e os outros grupos e condições experimentais. Para o AR, o grupo Wistar CO apresentou maior número de células positivas do que as outras linhagens e condições experimentais. Não houve interação do etanol com a SM sobre o p63 do epitélio secretor da glândula de coagulação de ratos UCh (Tab.6).

#### *Análise hormonal*

Houve interação do etanol com a separação materna sobre a concentração plasmática de testosterona e corticosterona. Na dosagem de testosterona, o grupo Wistar CO apresentou maior valor do que seu controle e as outras linhagens. Na dosagem de corticosterona, o grupo Wistar CO apresentou maior valor do que a condição experimental SM e as outras linhagens, e os grupos UCh (SM) apresentaram valores maiores que seus controles (Tab. 7).

## **DISCUSSÃO**

Sabe-se que o etanol causa alterações morfofisiológicas no sistema genital masculino como atrofia testicular, diminuição na concentração espermática, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, das concentrações séricas de testosterona, redução do peso e atrofia epitelial das glândulas sexuais acessórias [15, 16].

A separação materna é fator estressante que pode suprimir atividades dos eixos HHG e HHA, modulando as respostas orgânicas ao estresse, como a função reprodutiva [17, 18]. Portanto, o etanol e o estresse atuam sobre as funções reprodutivas, produzindo efeitos prejudiciais diferentes dependentes dos fatores estressantes, havendo respostas distintas frente a variedade de protocolos experimentais.

Não foram encontrados na literatura especializada trabalhos que correlacionem a separação materna e a ingestão de etanol sobre a massa da vesícula seminal e glândula de coagulação. Não houve interação da separação materna e da ingestão de etanol sobre a massa da vesícula seminal e glândula de coagulação em nossos achados. Resultados contrários foram observados em alguns trabalhos anteriores, onde o etanol promove a redução da massa das glândulas sexuais acessórias [19, 20, 21, 22 e 23]. Fávoro et al. [24] relataram que ratos que ingerem etanol e nicotina apresentaram redução de massa da vesícula seminal e da glândula de coagulação em relação aos ratos que receberam somente

etanol ou nicotina, indicando interação entre as drogas. Entretanto, Cagnon et al. [25] não observaram redução da massa da vesícula seminal e da glândula de coagulação de camundongos C57/B1/6J tratados com solução de etanol a 6% durante 120 dias, porém observou atrofia epitelial.

O etanol e a separação materna interagem sobre o epitélio da vesícula seminal e glândula de coagulação, sendo o modo de ação do etanol e da separação materna, dependentes, utilizando-se do mesmo ou semelhante mecanismo de ação sobre a regulação do volume do epitélio glandular, provavelmente relacionados com o controle osmótico celular. O acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma decorrentes da ingestão de etanol [26, 27] aumenta a densidade no interior da célula, aumentando o potencial osmótico que pode levar ao desequilíbrio na entrada e saída de líquidos intracelulares, alterando os volumes celulares [5]. A atrofia epitelial é a alteração morfológica decorrente da ingestão do etanol, estando associada à diminuição das concentrações plasmáticas de testosterona, podendo ser ou não potencializada pela separação materna [5, 21, 6]. A atrofia epitelial pode ser consequência dos efeitos tóxicos diretos e indiretos do etanol no sistema genital masculino. O etanol age diretamente no testículo, diminuindo o número de receptores de LH (hormônio luteinizante) nas células de Leydig e, conseqüentemente, a produção de testosterona. O etanol age indiretamente no eixo HHG, suprimindo a liberação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) pelo hipotálamo que estimula a hipófise anterior a liberar LH, induzindo a produção de testosterona pelas células de Leydig. A testosterona regula a liberação de GnRH pelo hipotálamo e LH pela hipófise anterior através do mecanismo de *feedback* negativo. Portanto, a separação materna e o etanol atuam sobre os eixos HHG e HHA, provavelmente, utilizando-se de mecanismos de ação semelhantes sobre os eixos HHG e HHA.

Ratos submetidos à SM durante as primeiras semanas de vida apresentaram aumento prolongado dos níveis plasmáticos de corticosterona a estímulos estressantes na vida adulta, sendo atribuído a diminuição da eficiência da regulação do *feedback* da corticosterona no hipotálamo, tornando o eixo HHA hiper-responsivo ao estresse [28]. A incapacidade de metabolização do acetaldeído na ingestão crônica de etanol e seu acúmulo conduzem à toxicidade orgânica e estimulam a atividade do eixo HHA. Ratos expostos a ingestão crônica de etanol apresentam maior atividade do eixo HHA pela elevada síntese e liberação de CRF (fator liberador de corticotrofina), aumentando os níveis séricos de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e, conseqüentemente, de corticosterona, embora alguns graus de tolerância possam ser observados [8]. A liberação de corticosterona das

adrenais parece inibir a secreção de testosterona através dos receptores glicocorticóides testiculares localizados no interstício testicular [29, 30]. A diminuição das concentrações de corticosterona plasmática através da retirada cirúrgica das adrenais inibiu a secreção de testosterona [31]. Portanto, deve haver concentrações ideais de corticosterona plasmática para a adequada produção e liberação de testosterona. No presente trabalho, a ingestão de etanol e a separação materna aumentaram as concentrações de corticosterona e diminuíram as de testosterona.

Houve interação do etanol com a separação materna sobre a expressão da p63 na vesícula seminal. A p63 está envolvida na regulação do ciclo celular atuando na resposta ao estresse e no desenvolvimento, sendo utilizada como marcador de células basais do epitélio glandular [32, 33]. Portanto, sua diminuição é indicativa de danos celulares decorrentes de alterações no metabolismo celular epitelial que podem ocasionar morte celular programada ou apoptose [33].

Nonclearq *et al.* [34] relataram aumento da proliferação celular da vesícula seminal, causando hiperplasia do epitélio e do estroma fibromuscular, decorrentes do efeito combinado da diminuição de andrógeno e estrogenização. Observou-se interação do etanol com a separação materna sobre a proliferação celular da vesícula seminal e glândula de coagulação. Sugere-se que o aumento da proliferação celular seja resposta à diminuição da testosterona e a atrofia epitelial.

Os andrógenos são essenciais para o funcionamento e manutenção da estrutura das glândulas sexuais acessórias e suas ações são mediadas através de seus receptores nucleares (AR) que se unem aos genes alvos promovendo a transcrição de proteínas [35], incluindo sua própria transcrição. Houve interação do etanol com a separação materna sobre a expressão do receptor de andrógenos (AR) da vesícula seminal e glândula de coagulação. A diminuição na marcação do AR ocorreu devido à diminuição da testosterona, ocasionada pela desregulação dos eixos HHG e HHA.

Verificou-se que a SM, durante as duas primeiras semanas de vida, pode potencializar os efeitos prejudiciais da ingestão crônica de etanol. Esse período, caracterizado pela quiescência do eixo HHA em responder ao aumento de corticosterona a influências externas (SHRP), é encontrado somente em roedores e parece prevenir e adequar respostas do eixo à atividade futura, relativas às condições ambientais presentes [36, 37]. A SM sugere ambiente estressor, pois a ausência da mãe priva os filhotes de cuidados maternos essenciais [38], reduz a temperatura corporal, a frequência da amamentação e os cuidados à excreção [39]. O estresse ambiental (evocação de medo e

estresse) e alterações dos cuidados maternos podem independentemente ser usados pelos filhotes como sinal de adversidade do ambiente futuro, ocorrendo ajuste adaptativo do fenótipo, modificando a resposta do sistema neuroendócrino em situações de estresse [40]. Ajustar o fenótipo de acordo com o ambiente pode ser altamente adaptável e, conseqüentemente, favorável à sobrevivência [41, 42]. Assim, verifica-se que a plasticidade no período SHRP pode contribuir com ajustes adaptativos para superar as possíveis adversidades futuras à reprodução, ou potencializar os efeitos danosos do etanol. Acredita-se que possíveis dificuldades relatadas em manter a saúde do animal, como o surgimento de distúrbios metabólicos [36, 43] possa ser originado da tentativa de manter as funções reprodutivas.

Portanto, houve interação do etanol (droga) com a SM (estresse) sobre o epitélio da vesícula seminal e glândula de coagulação, desequilibrando os eixos HHG e HHA, podendo levar a potencialização das alterações sobre a reprodução. Dessa forma, infere-se que diferentes drogas e agentes estressores podem interagir sobre as glândulas sexuais acessórias, podendo provocar respostas semelhantes do epitélio secretor da vesícula seminal e glândula de coagulação através de mecanismos de ação similares que devem ser investigados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Fergert B, Feldon J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav.* 2005; 29:649-674.
2. Holmes A, Le Guisquet A-M, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2005; 29:1335-1346.
3. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997; 277:1659-1662.
4. Kim JH, Kim HJ, Noh HS, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Park SK, Lee BJ, Choi WS. Suppression by ethanol of male reproductive activity. *Brain Research.* 2003; 989:91-98.



5. Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregón E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2000; 32:175-184.
6. Oliva SU, Messias AG, Silva DA, Pereira OC, Gerardin DC, Kempinas WG. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reprod Toxicol.* 2006; 22:599-605.
7. Wallock-Montelius LM, Villanueva JA, Chapin RE, Conley AJ, Nguyen HP, Ames BN, Halsted CH. Chronic Ethanol Perturbs Testicular Folate Metabolism and Dietary Folate Deficiency Reduces Sex Hormone Levels in the Yucatan Micropig. *Biology Of Reproduction.* 2007; 76:455–65.
8. Emanuele MA, Emanuele N. Alcohol and the Male Reproductive System. *Alcohol Research & Healt.* 2001; 25:234-245.
9. Teixeira GR. Efeitos da separação materna e do alcoolismo no epidídimo de ratos UCh (Bebedor voluntário de etanol a 10%). 2007. Mestrado. IBB/UNESP. Botucatu: IBB/UNESP. 2007.
10. Martins OA. Estresse, alcoolismo e vitamina E: avaliação de parâmetros bioquímicos e morfofisiologia prostática. 2007. Doutorado. IBB/UNESP. Botucatu: IBB/UNESP. 2007.
11. Kremer R. Efeitos da separação materna e do alcoolismo sobre a estrutura do epitélio germinativo do testículo e sobre a produção espermática diária de ratos machos UCh (bebedores voluntários de etanol). 2007. Mestrado. IBB/UNESP. Botucatu: IBB/UNESP. 2007.
12. Oliveira SA. Morfometria do cerebelo de ratos machos UChA e UChB submetidos a separação materna neonatal (consumidores voluntários de etanol). 2008. Mestrado. IBB/UNESP. Botucatu: IBB/UNESP. 2008.
13. Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-Two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehavioral toxicology and teratology.* 1983; 5:171-178.
14. Banzatto AD, Kronka, SN. *Experimentação agrícola.* Jaboticabal: Funep; 1989:247.
15. Fávaro WJ, Cagnon VHA. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue and Cell,* 2006; 38:311-323.

16. Cândido EM, Carvalho CAF, Martinez FE, Cagnon VHA. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biology International*. 2007; 31:459-472.
17. Cameron J L. Interrelationships between hormones, behavior, and affect during adolescence: complex relationships exist between reproductive hormones, stress-related hormones, and the activity of neural systems that regulate behavioral affect. Comments on part III. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004; 1021:134-142.
18. Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB. Parental depression: animal models of an adverse live event. *Am. J. Psychiatry*. 2002; 159(08):1265-1283.
19. Martinez FE; Garcia PJ; Padovani CR; Cagnon VH; Martinez M. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *The Prostate*. 1993; 22:317-324.
20. Martinez FE; Garcia PJ; Padovani CR; Cagnon VH; Martinez M. A morphometric ultrastructural study of the seminal vesicle of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1997; 29:537-542.
21. Cagnon VH, Garcia PJ, Martinez FE, Martinez M, Padovani CR. Ultrastructural study of the coagulating gland of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *Prostate*. 1996; 28(6):341-346.
22. Cagnon VH, Garcia PJ, Guazzelli Filho J, Martinez FE, Mello W Jr, Martinez M. Ultrastructural study of the lateral lobe of the prostate of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1998; 30(1):77-84.
23. Sáttolo S, Carvalho CA, Cagnon VH. Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue Cell*. 2004; 36(6):417-430
24. Fávaro WJ, Cagnon VH. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue Cell*. 2006; 38(5):311-23.
25. Cagnon VH, Tomazini FM, Garcia PJ, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57B1/6J) submitted to chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell*. 2001; 33(4):354-60.
26. Cândido EM, Carvalho CAF, Martinez FE, Cagnon VHA. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biology International*. 2007; 31:459-472.

27. Martinez M, Reis GS, Pinheiro PFF, Almeida CCD, Cagnon VHA, Mello-Junior W, Pereira, S, Padovani CR, Martinez FE. Evaluation of the ethanol intake on the *Calomys callosus* seminal vesicle structure. *Micron*. 2007.
28. Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, Agnati LF. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci*. 1998; 16:187-197.
29. Hennessy MB. Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997; 21:11-29.
30. Vázquez DM. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*. 1998; 23:663-700.
31. Frankel AI, Ryan EL. Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. *Biol. Reprod*. 1981; 24:491-495.
32. Saito k, Kawakami S, Okada Y, Koga F, Kageyama Y, Kihara K. Spatial and Isoform Specific p63 Expression in the Male Human Urogenital Tract. *The Journal of Urology*. 2006, 176: 2268-2273.
33. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13:962-972.
34. Nonclearq D, Zanen J, Toubeau G, Laurent G, Stienon HAJ. Apoptosis and cell proliferation in the seminal vesicles and coagulating glands of male Syrian hamsters exposed to diethylstilboestrol (DES). *Reprod. Fertil. Dev*. 1999;11:111-122.
35. Yamashita S. Localization of Estrogen and Androgen Receptors in Male Reproductive Tissues of Mice and Rats. *The anatomical Record Part A*. 2004; 279A: 768-778.
36. Biagini G, Pich EM. Corticosterone administration to rat pups, but not maternal separation, affects sexual maturation and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the testis. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 73:95-103.
37. Smith MA, Kim SY, van Oers HJ, Levine S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*. 1997; 138(11):4622-4628.
38. Meaney, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci*. 2001; 24:1161–1192.

39. Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*. 2003; 68:439-445.
40. Macri S, Würbel H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Horm Behav*. 2006; 50:667-680.
41. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. Developmental plasticity and human health. *Nature*. 2004; 430:419-421.
42. Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG, Bateson P. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005; 272:671-677.
43. Lehmann J, Russig H, Feldon J, Pryce CR. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 2002; 73:141-145.

*Abreviaturas:*

Figs. – figuras

Tab. – tabela

Tabela 1. Características dos anticorpos utilizados.

<i>Anticorpos</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Espécie hospedeira</i>	<i>Diluição</i>	<i>Fonte</i>
<b><u>Primário</u></b>				
<i>Proteína p63</i>	Células basais	Camundongo (monoclonal)	1/50	Dako Cyt®
<i>PCNA</i>	Proliferação Celular	Camundongo (monoclonal)	1/100	Novocastra Laboratories Ltd®
<i>Receptor de Andrógono</i>	Células epiteliais	Coelho (policlonal)	1/300	Santa Cruz Biotechnologies®
<b><u>Secundário</u></b>				
	Anti-camundongo	Coelho (monoclonal)	1/100	Dako Cyt®
	Anti-coelho	Cabra (monoclonal)	1/500	Dako Cyt®

Tabela 2. Média e desvio-padrão da massa (g) da vesícula seminal e glândula de coagulação dos ratos UChA, UChB e Wistar - CO e SM.

Linhagens	Condição Experimental	Vesícula seminal + glândula de coagulação
		Média e desvio-padrão
Wistar	CO	0,520±0,162a <sup>1</sup> A <sup>2</sup>
	SM	0,539±0,045aA
UChA	CO	0,481±0,052aA
	SM	0,496±0,076aA
UChB	CO	0,571±0,110aA
	SM	0,627±0,089aA

<sup>1</sup>comparação entre as linhagens de ratos fixada a condição experimental.

<sup>2</sup>comparação da condição experimental fixada a linhagem de rato (p<0,05).

Tabela 3. Média e desvio-padrão da altura do epitélio da vesícula seminal (µm) dos ratos UChA, UChB e Wistar - CO e SM.

Linhagens	Condição Experimental	Altura do epitélio da vesícula seminal
		Média e desvio-padrão
Wistar	CO	24,11±0,37 b <sup>1</sup> B <sup>2</sup>
	SM	18,56±0,64 bA
UChA	CO	21,96±0,81 aB
	SM	17,06±0,89 aA
UChB	CO	22,45±0,45 aB
	SM	16,81±0,42 aA

<sup>1</sup>comparação entre as linhagens de ratos fixada a condição experimental.

<sup>2</sup>comparação da condição experimental fixada a linhagem de rato (p<0,05).

Tabela 4. Mediana e valores mínimo e máximo da altura do epitélio da glândula de coagulação ( $\mu\text{m}$ ) dos ratos UChA, UChB e Wistar - CO e SM.

Linhagens	Condição Experimental	Altura do epitélio da glândula de coagulação
		Mediana e valores mínimo e máximo
Wistar	CO	17,02 (16,87-17,22) a <sup>1</sup> B <sup>2</sup>
	SM	12,76 (11,86-12,94) aA
UChA	CO	16,80 (15,75-18,80) aB
	SM	10,03 (9,42-10,65) aA
UChB	CO	16,60 (16,15-16,88) aB
	SM	10,06 (9,58-10,46) aA

<sup>1</sup>comparação entre as linhagens de ratos fixada a condição experimental.

<sup>2</sup>comparação da condição experimental fixada a linhagem de rato ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5. Mediana e valores mínimo e máximo do número de células positivas (+/1000) da imunomarcção da proteína p63, do receptor de andrógenos (AR) e do PCNA no epitélio da vesícula seminal dos ratos UChA, UChB e Wistar - CO e SM.

Imuno-histoquímica	Linhagens	Condição Experimental	Número de células positivas na vesícula seminal
			Mediana e valores mínimo e máximo
p63	Wistar	CO	99 (88-108) b <sup>1</sup> B <sup>2</sup>
		SM	86 (71-95) aA
	UChA	CO	78 (73-84) aA
		SM	83 (70-90) aA
	UChB	CO	81 (75-89) aA
		SM	85 (76-90) aA
AR	Wistar	CO	683 (639-696) bA
		SM	531 (522-551) bA
	UChA	CO	488 (449-504) aB
		SM	435 (419-448) aA
	UChB	CO	468 (434-501) aA
		SM	463 (419-495) aA
PCNA	Wistar	CO	169 (154-184) bB
		SM	132 (103-146) aA
	UChA	CO	132 (120-146) aA
		SM	125 (107-136) aA
	UChB	CO	161 (144-171) bA
		SM	180 (168-192) bB

<sup>1</sup>comparação entre as linhagens de ratos fixada a condição experimental.

<sup>2</sup>comparação da condição experimental fixada a linhagem de rato ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Mediana e valores mínimo e máximo do número de células positivas (+/1000) da imunomarcagem da proteína p63, receptor de andrógenos (AR) e PCNA do epitélio da glândula de coagulação dos ratos UChA, UChB e Wistar - CO e SM.

Imuno-histoquímica	Linhagens	Condição Experimental	Número de células positivas na glândula de coagulação
			Mediana e valores mínimo e máximo
p63	Wistar	CO	118 (112-123) a <sup>1</sup> A <sup>2</sup>
		SM	102 (97-104) aA
	UChA	CO	112 (109-119) aA
		SM	111 (108-114) aA
	UChB	CO	118 (112-125) aA
		SM	118 (112-122) aA
AR	Wistar	CO	563 (549-625) bB
		SM	419 (406-432) aA
	UChA	CO	401 (368-429) aA
		SM	327 (319-334) aA
	UChB	CO	393 (369-432) aA
		SM	429 (407-442) aA
PCNA	Wistar	CO	191 (176-210) aA
		SM	169 (159-182) aA
	UChA	CO	198 (183-210) aA
		SM	183 (174-193) abA
	UChB	CO	200 (194-212) aA
		SM	211 (207-223) bA

<sup>1</sup>comparação entre as linhagens de ratos fixada a condição experimental.

<sup>2</sup>comparação da condição experimental fixada a linhagem de rato (p<0,05).

Tabela 7. Médias e desvio-padrão das concentrações hormonais plasmáticas de testosterona e corticosterona (ng/ml) dos ratos UChA, UChB e Wistar - CO e SM.

Linhagens	Condição experimental	Hormônios	
		Testosterona	Corticosterona
Wistar	CO	1,0±0,4 bB	57,4±16,4 bB
	SM	0,7±0,3 aB	18,6±11,7 aA
UChA	CO	0,3±0,1 aA	10,0±4,4 aA
	SM	0,5±0,2 aAB	28,6±13,5 bA
UChB	CO	0,4±0,1 aA	37,3±11,1 aB
	SM	0,3±0,1 aA	67,2±24,8 bB

<sup>1</sup>comparação entre as linhagens de ratos fixada a condição experimental.

<sup>2</sup>comparação da condição experimental fixada a linhagem de rato (p<0,05).

Figs. 1A - F. Fotomicrografias do epitélio secretor da vesícula seminal de ratos Wistar e UChA.

Figs. 1A e B. Expressão da proteína p63: (A) Grupo W-CO apresentou maior número de células positivas, (B) Grupo W-SM apresentou menor número de células positivas. Ep = epitélio; L = luz; Seta = núcleo positivo para p63; Barra = 20  $\mu$ m.

Figs. 1C - F. Expressão do receptor de andrógeno (AR), (C) Grupo W-CO apresentou maior número de células positivas do que o grupo W-SM (D). (E) Grupo UChA-CO apresentou maior número de células positivas do que o grupo UChA-SM (F). Ep = epitélio; L = luz; Seta = núcleo positivo para AR; Barra = 20  $\mu$ m.



Figs. 2A – D. Fotomicrografias do epitélio secretor da glândula de coagulação de ratos Wistar e UChB.

Figs. 2A e B. Expressão do receptor de andrógeno (AR), (A) Grupo W-CO apresentou maior número de células positivas, (B) Grupo W-SM apresentou menor número de células positivas. Ep = epitélio; L= luz; Seta = núcleo positivo para AR; Barra = 20  $\mu$ m.

Figs. 2C e D. Expressão do PCNA, (C) Grupo UChB-CO apresentou menor número de células positivas, (D) Grupo UChB-SM apresentou maior número de células positivas. Ep = epitélio; L = luz; Seta = núcleo positivo para PCNA; Barra = 20  $\mu$ m.

Figs. 3A - D. Fotomicrografias do epitélio secretor da vesícula seminal de ratos Wistar e UChB.

Figs. 3A - D. Expressão do PCNA, (A) Grupo W-CO apresentou maior número de células positivas do que o grupo W-SM (B), (C) Grupo UChB-CO apresentou menor número de células positivas do que o grupo UChB-SM (D). Ep = epitélio; L = luz; Seta = núcleo positivo para PCNA; Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

## **VI – CONCLUSÕES**

Há interação entre a separação materna e a ingestão de etanol sobre a vesícula seminal e a glândula de coagulação de ratos UCh. Há desequilíbrio dos eixos HHG e HHA, podendo levar a potencialização das alterações sobre a reprodução. Infere-se que diferentes drogas e agentes estressores podem interagir sobre as glândulas sexuais acessórias, podendo provocar respostas semelhantes do epitélio secretor através de mecanismos de ações similares que devem ser investigados.