

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Leonardo de Oliveira Mendes

**“MASTÓCITOS NO LOBO VENTRAL DA PRÓSTATA,
NO EPIDÍDIMO E NO TESTÍCULO DE RATOS UChB
(CONSUMIDORES VOLUNTÁRIOS DE ETANOL A 10%)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Leonardo de Oliveira
Mendes
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de Mestre
em Biologia Celular e Estrutural, na área de
Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

Co-Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Oliani

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M522m	<p>Mendes, Leonardo de Oliveira Mastócitos no lobo ventral da próstata, no epidídimo e no testículo de ratos UchB (consumidores voluntários de etanol a 10%) / Leonardo de Oliveira Mendes. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Francisco Eduardo Martinez. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Rato. 2. Próstata - Lobo ventral. 3. Testículos. 4. Epidídimo. 5. Álcool. 6. Mastócitos. I. Martinez, Francisco Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Mast cells in the ventral prostate, epididymis and testis of UchB – ethanol preferring rats (10% v/v high ethanol voluntary intake).

Palavras-chave em inglês: Rats; Prostate - Ventral lobe; Testis; Epididymis; Alcohol; Mast Cells.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Francisco Eduardo Martinez, Jair de Campos Soares, Raquel Fantin Domeniconi.

Data da defesa: 29/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

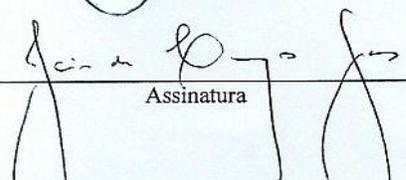
Campinas, 29 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

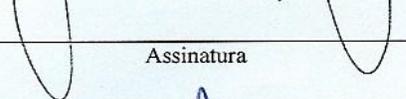
Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez (Orientador)


Assinatura

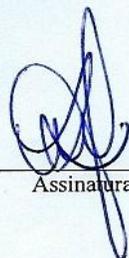
Prof. Dr. Jair de Campos Soares


Assinatura

Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi


Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano


Assinatura

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Assinatura

“Por mais humilde que seja, um bom trabalho inspira uma sensação de vitória”

Jack Kemp

“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra”

Aristóteles

Dedicatória

Á minha FAMÍLIA, meus pais (“Bagaço” e “Dora”) e meu irmão (Vi) pelo amor e incentivo dedicados a mim. São o meu porto seguro... Sempre estarão lá!

Á Deus
“Fé é dar o primeiro passo, mesmo quando você não vê toda a escada”
Martin Luther King

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez, pela orientação, disponibilidade em sanar minhas dúvidas a todo instante e por me tranquilizar, mostrando soluções quando eu acreditava que não haveria.

À Profa. Dra. Sônia Maria Oliani pela confiança em me co-orientar, sempre disposta a me ajudar a entender melhor os “mast”.

À Profa. Patrícia Fernandes Felipe Pinheiro, pelo papel indispensável que teve em meu trabalho, não somente na rotina de imunohistoquímica, a qual não seria realizada sem sua ajuda, mas também durante todo o meu mestrado, onde foi, acima de tudo, uma grande amiga.

Aos docentes do Departamento de Anatomia Humana (Raquel, Anchieta, Jair, Sérgio, Wilson) pela amizade e por estarem sempre dispostos a esclarecer qualquer dúvida.

Às Profas. Dras. Maeli e Patrícia, do Departamento de Histologia, pela oportunidade e confiança para realizar o estágio docência, que se tornou um grande aprendizado.

Aos Profs. Drs. Wagner José Fávoro, Alexandre Oliveira e Luis Violin pelas considerações feitas no meu exame de qualificação, que foram de grande valia para minha formação acadêmica.

Aos Profs. Drs. Wellerson Rodrigo Scarano, Jair de Campos Soares, Maria Célia Jamur pelas críticas altamente construtivas feitas na análise prévia deste trabalho.

À Profa. Isabel Cristina Cherici Camargo, por ter me ensinado os primeiros passos na carreira científica.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e aos seus docentes por conseguirem manter o excelente nível de qualidade por todos esses anos.

À melhor secretária da Unicamp, Liliam Alves Senne Panágio, sempre preocupada com os alunos, mostrando incrível dedicação ao programa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à CAPES pelo importante apoio financeiro.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, em especial à secretária Jerusa Verpa pela disponibilidade sempre apresentada e ao técnico de laboratório e grande amigo Gelson Rodrigues, pelas intermináveis horas passadas em frente ao micrótomo, sempre de bom humor, tornando o trabalho mais prazeroso.

À Tatiana Aparecida Pimentel, pós-graduanda do Laboratório de Imunomorfologia, pela paciência e dedicação ao meu trabalho, sempre disposta a ajudar.

Aos grandes amigos que a Anatomia me proporcionou: João, Gustavo, Giovana, Beatriz e Fabiana, pelos inúmeros momentos de risadas e ajuda nos problemas comuns à pós-graduação, mostrando que para tudo há uma solução.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia, em especial Satrapa, Dé, Renato, Thaís, Cíntia, Janahí, Rafaela, Walter, Guta, Cicília, pelos inúmeros churrascos, festas, jogatinas de imagem e ação, risadas, momentos de extrema felicidade que tornam a minha vida em Botucatu bem melhor.

Ao Émerson (Couve) e à Sabrina (Sá) por me abrigarem inicialmente em Botucatu e depois, tornando-se companheiros de república, dividindo comigo os momentos de alegria e tristeza desta nova vida.

Aos meus grandes irmãos dos tempos da faculdade e para vida inteira, Rafael (Coça), Marta (Martinha), Lucas (Luketi), Amanda (Tuta), Danilo (Jacira) e Eduardo (Bitinga)

simplesmente por existirem. *“Das coisas que a sabedoria proporciona para tornar a vida inteiramente feliz, a maior de todas é a amizade”* Epicuro.

Aos meus amigos de infância, os “cecapianos”, que fazem das minhas idas a Tupã momentos de imensa felicidade!

À Família “buscapé”, tios, primos e avós: que formam minha base e de onde partiu os primeiros ensinamentos.

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	12
Introdução Geral.....	14
Alcoolismo.....	14
Próstata, epidídimo e testículo: estrutura e função.....	16
Etanol e sistema genital masculino.....	19
Mastócitos, etanol e sistema genital masculino.....	20
Justificativas e Objetivos.....	24
Artigo.....	26
Conclusão Final.....	56
Referências da Introdução Geral.....	57

Resumo

O alcoolismo tem atingido proporções alarmantes em todo o mundo, porém são escassas as investigações sobre o efeito inflamatório do etanol nos órgãos reprodutivos. O mastócito é uma das principais células envolvidas nos processos inflamatórios, com a presença de dois subtipos em roedores, de tecido conjuntivo (CTMC) e de mucosa (MMC). O objetivo desse trabalho é localizar e quantificar os mastócitos no lobo ventral da próstata, testículo e epidídimo de ratos UChB e avaliar o possível efeito do etanol sobre o número de mastócitos nos órgãos analisados. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (n=10/grupo): UChB com administração de etanol a 10% (UChBet), UChB sem administração de etanol (UChBco) e Wistar (W). Amostras do lobo ventral da próstata, do epidídimo e do testículo direitos foram coletadas após 180 dias de experimentação e processadas para análise em microscopia de luz. O material foi corado com azul de toluidina para identificação dos mastócitos totais, além de imunohistoquímica para identificação dos CTMC. Os animais que receberam etanol apresentaram maior quantidade de mastócitos desgranulados na próstata. Não houve diferença estatística no número de mastócitos, intactos e desgranulados, no testículo. O epidídimo apresentou diferenças de acordo com o segmento analisado. Houve maior densidade de mastócitos intactos e desgranulados no UChBet que no UChBco no segmento inicial. O grupo W apresentou elevada densidade de mastócitos intactos na região da cabeça, não havendo diferença estatística quanto aos mastócitos desgranulados nesta região. A região do corpo do epidídimo não revelou diferenças entre os grupos para os mastócitos intactos, porém quanto aos mastócitos desgranulados houve aumento do número nos animais que receberam etanol. Não houve diferenças quanto ao número de mastócitos intactos na região da cauda do epidídimo, porém

houve aumento de mastócitos desgranulados no UChBet. A próstata dos animais UChBet apresentou maior quantidade de CTMC, além de número maior de MMC. Houve maior quantidade de CTMC no testículo de ratos W e, proporcionalmente, maior quantidade de MMC nos grupos UChB. No epidídimo houve menor marcação para CTMC nos animais UChB, com aumento proporcional de MMC. Conclui-se que o etanol aumenta o número de mastócitos desgranulados e de MMC e, conseqüentemente, pode desencadear processos inflamatórios na próstata, epidídimo e testículo de ratos UChB.

Palavras chave: ratos, lobo ventral da próstata, testículo, epidídimo, etanol, mastócitos.

Abstract

Alcoholism has reached alarming proportions throughout the world, but there is little research on the inflammatory effect of ethanol in the reproductive organs. The mast cell, which is one of the main cells involved in inflammatory processes, is known to have two subtypes in rodents, connective (CTMC) and mucosal (MMC) tissue. Hence, the aim of this work is to locate and quantify mast cells in the ventral lobe of the prostate, in the testis and epididymis of UChB rats and then assess if there is a relation between ethanol ingestion and the number of mast cells in these organs. The animals were divided into three experimental groups (n = 10/group): UChB rats that received 10% ethanol administration (UChBet); UChB rats without ethanol administration (UChBco); and Wistar rats (W). Samples of the ventral lobe of the prostate, right testis and right epididymis were collected after 180 days of experiments and processed for light microscopy analysis. The material was stained with toluidine blue for identification of total mast cells and immunohistochemistry was performed for CTMC identification. The animals who received ethanol exhibited high density of degranulated mast cells in the ventral prostate. There wasn't statistic difference in the number of mast cells, intact e degranulated, in the testis. The epididymis showed differences according to the analyzed segment. There was a higher density of intact and degranulated mast cells in UChBet when compared to UChBco in the initial segment. A high density of intact mast cells in the epididymal caput was observed in W, with no difference in the degranulated cells regarding this region. There was no difference between groups for intact mast cells in the region of the epididymal corpus, but the number of degranulated mast cells was higher in animals that received ethanol. There was no difference regarding the number of intact mast cells in the epididymal cauda, but the number of degranulated mast cells was higher in

animals that received ethanol. There was a greater number of CTMC in the prostate of UChBet rats and a greater amount of MMC as well. There was higher amount of CTMC in the W rat testis and, proportionally, greater amount MMC in UChB groups. Staining for CTMC in epididymis of UChB animals was lower than W animals, which allows the establishment of a higher proportion of MMC in these animals. We concluded that ethanol increases the number of degranulated mast cells and MMC, and thus, it could be promoting inflammation in the prostate, epididymis and testis of UChB rats.

Key Words: rats, ventral lobe of the prostate, testis, epididymis, ethanol, mast cells.

Introdução Geral

Alcoolismo

O alcoolismo é uma síndrome multifatorial que compromete os aspectos físico, mental e social do indivíduo (Edwards & Gross, 1976). O Serviço de Saúde Pública dos EUA conceituou como alcoólico o indivíduo que ingere cronicamente mais do que 32 *oz* (*ounce* = 28,35g) de *wisky* (43% de etanol) diariamente ou quantidade equivalente de outras bebidas alcoólicas (*US Department of Health*, 1978). Pesquisa da Organização Mundial de Saúde demonstrou que 17% da população mundial são alcoólicas, sendo que no Brasil o alcoolismo é um dos mais graves problemas de saúde, decorrente de complicações no campo somático-psíquico e pela repercussão no meio social (Fortes & Cardo, 1991; Halsted, 2004).

O etanol e os seus metabólitos provocam distúrbios generalizados em vários sistemas orgânicos e no metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas (Hirata & Hirata, 1991; Martinez *et al.*, 2001a,b; Gomes *et al.*, 2002). Por induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o etanol é capaz de desestabilizar proteínas e lipídeos celulares (lipoperoxidação), favorecendo o processo de apoptose e necrose, prejudicando a homeostasia tecidual. Tanto o etanol quanto o seu metabólito, o acetaldeído, tem efeitos sobre vários fatores de crescimento celular, inibindo a síntese de ácido retinóico e a proliferação celular (Riley *et al.*, 2001).

O consumo crônico de etanol está associado ao aumento do retículo endoplasmático liso no fígado, local onde ocorre a oxidação de, aproximadamente, 95% do etanol presente no sangue (Gayoto & Alves, 2001). A metabolização do etanol segue três vias diferentes nos hepatócitos: (1^a) o sistema da enzima álcool desidrogenase (ADH) na matriz citoplasmática, responsável pela

maior parte do processo; (2^a) o sistema microsossomal de oxidação (MEOS) no retículo endoplasmático e (3^a) sistema da catálise binária nos peroxissomos (Tampier *et al.*, 1994). O acetato é lançado na corrente sanguínea, sendo rapidamente metabolizado nos tecidos em dióxido de carbono e água (Lieber, 1993).

O etanol é potente indutor de teratogênese em humanos. Quando ingerido durante a gestação pode levar ao aparecimento de um quadro conhecido como Síndrome Alcoólica Fetal (Hoyme *et al.*, 2005), caracterizada por anormalidades faciais, crescimento retardado, dificuldades intelectuais e problemas comportamentais (Krulwich, 2005).

O consumo de etanol está ligado ao aumento do fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, principalmente na cavidade oral, faringe, esôfago e laringe. Poschl & Sertz (2004) propõe que o etanol não atue diretamente na indução de tumores, mas como agente promotor. Esse potencial co-carcinogênico foi comprovado por Garro & Lieber (1990), que evidenciaram que o etanol aumentou o efeito carcinogênico de algumas substâncias, entre elas os compostos aromáticos policíclicos e algumas nitrosaminas, favorecendo o crescimento tumoral, diminuindo a capacidade de destoxificação, imunossupressão e inibição de enzimas de reparo do DNA lesado.

A alta concentração de etanol no sangue é responsável por grandes prejuízos no sistema nervoso, desencadeando deficiências neurológicas severas na medula espinhal (Forchleimer *et al.*, 2005), morfológicas e neuropsicológicas (Moselhy *et al.*, 2001). Entre alguns mecanismos cognitivos e transtornos emocionais causados pelo etanol, destacam-se: ausência de atenção, ansiedade, fobia, depressão e agressão (O'Connel *et al.*, 2005). Algumas das drogas mais utilizadas pelos indivíduos, como nicotina, cocaína, anfetaminas e opióides, junto com o etanol, possuem a mesma habilidade em ativar o sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (Grenhoff

et al., 1986; Clarke *et al.*, 1988; Koob, 1992; Blomqvist *et al.*, 1993), estrutura atuante no sistema de recompensa cerebral e chave no desenvolvimento e manutenção da dependência de drogas de abuso (Wise & Rompre, 1989).

Modelos animais têm contribuído para explicar alguns aspectos biológicos: bioquímicos, fisiológicos e morfológicos envolvendo o consumo de bebidas alcoólicas por humanos (Cândido *et al.*, 2007). Li *et al.* (1987) menciona a existência de três pares de linhagens de ratos de alto e baixo consumo de etanol. Os UChA e UChB (UCh = Universidade do Chile) os mais antigos, os de Helsink iniciados por Eriksson (1968) e os de Lumeng & Li em Indianápolis. As linhagens AA (*Alko Alcohol*) e ANA (*Alko Nonalcohol*) de Helsink foram obtidas por cruzamentos alternados de *inbreeding* e *outbreeding*. As linhagens P (*Alcohol Preferring* – 5-8g/kg/dia) e NP (*Non-Alcohol Preferring* – menos de 0,5/kg/dia) de Lumeng & Li tem sido obtidas por cruzamentos *outbreeding*. Além dessas linhagens de ratos, existem raças de camundongos, tanto de alto consumo, a C57BL/6, como de baixo consumo de etanol, a BALB e PBA. Dos três pares descritos, os únicos que se mantêm em *inbreeding* são os UChA e UChB e, por conseguinte, são as únicas linhagens consideradas puras para os efeitos de estudos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos do efeito do etanol, bem como apetite e tolerância, que são importantes fatores do alcoolismo humano.

Próstata, epidídimo e testículo: estrutura e função

O sistema genital masculino da maioria dos mamíferos é composto por testículo (gônada), epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais e órgão copulador.

Os testículos de homens localizam-se inferiormente ao pênis no interior do escroto (Tirapelli, 2008), envolvidos pela túnica albugínea, espessa capa de tecido conjuntivo denso

(Junqueira & Carneiro, 2004). A túnica albugínea se espessa e invagina, formando o mediastino testicular e dividindo o testículo em lóbulos (Tortora & Grabowski, 2002). Assim, cada testículo pode ser, funcionalmente e anatomicamente, dividido em dois compartimentos, intersticial e tubular, responsáveis pela esteroidogênese e espermatogênese, respectivamente (Rodriguez & Favaretto, 1999). No compartimento tubular, encontram-se os túbulos seminíferos que são alças contorcidas com extremidades conectadas na *rete testis* pelo túbulo reto (Russell *et al.*, 1990). Os túbulos seminíferos são constituídos pelo epitélio seminífero, células de Sertoli e são circundados por camada externa de células mióides e tecido conjuntivo associado, a túnica própria, e por membrana basal adjacente ao epitélio seminífero, separando-o da túnica própria (Ross *et al.*, 2003).

A espermatogênese é um processo elaborado onde células-tronco espermatogoniais tornam-se células haplóides altamente diferenciadas, os espermatozóides (Clermont, 1972). O compartimento intersticial se localiza entre os túbulos seminíferos e possui vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e células de Leydig, responsáveis pela produção de andrógenos, principalmente a testosterona, e fonte para uma variedade de outros esteróides (Russel *et al.*, 1990). Mastócitos e macrófagos são também comumente vistos no interstício, sendo que, em algumas espécies, os macrófagos podem representar 25% das células totais do local (Russel *et al.*, 1990). A função testicular é regulada pelas relações entre o hipotálamo, hipófise, hormônios testiculares e o compartimento germinativo (Sokol, 1997).

O epidídimo é formado por um ducto único, altamente contorcido, que liga os testículos aos vasos deferentes, sendo o sítio de maturação e armazenamento de espermatozóides. As funções do epitélio epididimário incluem absorção, secreção, síntese e metabolismo de algumas glicoprotéínas, criando meio apropriado para aquisição da habilidade para fertilização (Serre &

Robaire, 1998). Nos mamíferos em geral, o epidídimo é dividido anatomicamente em quatro regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. O segmento inicial e a cabeça estão relacionados à absorção da fase fluída do líquido seminífero, o corpo é responsável pela habilitação para fertilização (maturação) dos espermatozóides e a cauda, com suas partes proximal e distal, se destina à estocagem dos espermatozóides no ducto epididimário (Robaire & Hermo, 1998). Possui epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado, com seis tipos celulares distintos: principais, basais, claras, delgadas, halo e apicais. As principais, que são as mais abundantes, destacam-se nos processos de absorção, secreção (Serre & Robaire, 1998), endocitose e transcitose (Robaire & Hermo, 1998).

A próstata é formada por glândulas túbulo-alveolares ramificadas com ductos que desembocam na uretra prostática. É envolta por cápsula fibroelástica, rica em músculo liso, que envia septos para o interior da glândula. No homem, é compacta (alobular) apresentando três zonas: central, periférica e transição. No rato, a próstata é multilobulada, dividida em quatro pares de lóbulos: anterior, dorsal, ventral e lateral (Roy-Burman *et al.*, 2004). O epitélio é constituído de três tipos celulares: basal, secretor (luminal) e neuroendócrino (NE). As células basais são de reserva (*stem cell*) do epitélio prostático (Hazem *et al.*, 2002). As células secretoras contribuem com variedade de produtos do plasma seminal, incluindo o antígeno prostático específico (PSA) e a fosfatase ácida prostática (PAP) (Aumüller, 1983; Amüller, 1989). A célula NE contém serotonina e peptídeos ou neuropeptídeos (Di Sant'Agnese *et al.*, 1989; Vittoria *et al.*, 1990).

Etanol e sistema genital masculino

Vários estudos têm enfatizado os efeitos do consumo do etanol no sistema genital masculino em animais de laboratório. O etanol é tanto uma toxina direta, alterando a produção de testosterona nas gônadas, como indireta, atuando no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Van Thiel, 1983; Anderson *et al.*, 1989; Saxena *et al.*, 1990; Tadic *et al.*, 2000). Martinez *et al.* (2000) evidenciaram diferenças na histologia testicular de ratos UChA e UChB em relação aos Wistar controles. Os animais bebedores de etanol apresentaram desorganização epitelial, vacuolização, aumento do número de gotas lipídicas no citoplasma das células de Sertoli e perda de elementos germinativos, causando atrofia tubular seminífera. O etanol também age nas células de Leydig, reduzindo os receptores de LH, interferindo na síntese hormonal de testosterona (Bannister *et al.*, 1987; Adler, 1992).

Outras alterações testiculares podem ser verificadas em consequência do uso de etanol. Grattagliano *et al.* (1997) verificou aumentos das taxas de peroxidação lipídica e protéica, além da redução testicular de glutathione, responsável por aumento da ação dos radicais livres. As células germinativas também são afetadas, desencadeando aumento do processo apoptótico, que gera prejuízo à espermatogênese e infertilidade (Zhu *et al.*, 2000).

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina cujo interesse se relaciona a frequência de diferentes patologias, como a hiperplasia prostática benigna e o câncer (Guess, 2001). As consequências da toxicidade do etanol são complexas, sendo que persistem dúvidas sobre a morfofisiologia do estroma e sua interação com as células epiteliais em resposta ao alcoolismo crônico (Cândido *et al.*, 2007). Vários trabalhos abordaram a correlação entre o uso do etanol e a morfofisiologia da próstata. Martinez *et al.* (2001) relatou a atrofia do epitélio em ratos UChA e UChB comparados aos controles. Cândido *et al.* (2007) verificou a presença de

neoplasia intraepitelial prostática (PIN), seguido de hipertrofia e presença de células inflamatórias na próstata de ratos UChB. Favaro & Cagnon (2006) observaram aumento das cisternas do retículo endoplasmático rugoso de ratos tratados com etanol a 10% durante 90 dias, além da diminuição da testosterona e dos seus receptores na próstata (Favaro & Cagnon, 2008).

Alterações histopatológicas causadas pelo etanol podem também ser verificadas no epidídimo, onde a droga age diretamente no armazenamento de espermatozóides (Anderson *et al.*, 1983). Provoca baixa concentração e prejuízo na motilidade dos espermatozóides normais e aumento do número de teratozoospermia (Kucheria *et al.*, 1985; Gomathi *et al.*, 1993; Villalta *et al.*, 1997). Essas modificações seriam resultado de alterações que ocorrem no meio epididimário, levando ao comprometimento da maturação dos espermatozóides (Srikant *et al.*, 1999).

Ratos submetidos à ingestão crônica de etanol apresentaram o epidídimo com epitélio desorganizado, células claras com retículo endoplasmático e complexo de Golgi com cisternas dilatadas, além do aumento de gotas lipídicas nas células principais e claras, indicando alteração do metabolismo lipídico frente à ingestão de etanol (Pereira *et al.*, 2003). Martinez *et al.* (2000) verificou alterações significativas no epidídimo de ratos UCh, principalmente no segmento caudal, onde foi verificado atrofia do epitélio devido a diminuição da área citoplasmática.

Mastócitos, etanol e sistema genital masculino

Os mastócitos foram descobertos por Paul Ehrlich em 1879, como células com grânulos citoplasmáticos proeminentes e que teriam a função de ajudar na manutenção do tecido conjuntivo (Galli *et al.*, 1999). Posteriormente, sugeriram que eles fossem derivados de células T, fibroblastos ou macrófagos. Com estudos de Kitamura *et al.* (1979), foi admitido que eles são derivados de *stem cells* hematopoiéticas da medula óssea.

Desde o seu descobrimento, os mastócitos têm sido alvo de estudos controversos quanto ao seu papel em condições fisiológicas (Valchanov *et al.*, 1998). Estão distribuídos nos tecidos de mamíferos, próximos a vasos sanguíneos, nervos, epitélios, músculo liso (Noviana *et al.*, 2004), principalmente nos espaços perivasculares e tecido conjuntivo da pele e do trato respiratório e gastrointestinal (Metcalf & Boyce, 2006). Os mastócitos contêm ou sintetizam, após estímulos apropriados, potentes mediadores biologicamente ativos que podem ter efeitos diferentes na inflamação, na remodelação de tecidos (Galli *et al.*, 1999) e fibrose, defesa contra doenças infecciosas, angiogênese e biologia do câncer (Yamanaka *et al.*, 2000, Silistino-Souza *et al.*, 2007). Alguns produtos são pré-formados e estocados nos grânulos das células, como a histamina, serotonina, proteases, exopeptidases e neuropeptídeos (Karaca *et al.*, 2007), enquanto outros são sintetizados sob apropriada ativação celular, como as citocinas que são os mediadores mais recentemente identificados que influenciam na maturação, diferenciação e proliferação dos mastócitos (Noviana *et al.*, 2001)

Os mastócitos podem ser identificados nos tecidos de diferentes órgãos de acordo com o seu sítio tecidual, propriedades metacromáticas e seletividade para fixação (Noviana *et al.*, 2004). Estudos em roedores permitiram a subdivisão dessas células em: mastócitos de mucosa (MMC) e mastócitos de tecido conjuntivo (CTMC) (Damazo *et al.*, 2004). Morfologicamente, os MMCs são menores que os CTMCs, além de possuírem forma e grânulos de tamanhos variáveis. Com relação às diferenças dos conteúdos dos grânulos citoplasmáticos, enquanto os MMCs são ricos em condroitina-6-sulfato e quantidade limitada de histamina (De Jonge *et al.*, 2002; Damazo *et al.*, 2004), os CTMCs possuem a heparina, além de grandes quantidades de histamina (Welle, 1997; Damazo *et al.*, 2004). Os MMCs podem ser considerados células atípicas, T-dependentes, encontradas principalmente na mucosa do trato gastrointestinal e na lâmina própria do trato

respiratório. Ao contrário, os CTMCs são células T-independentes encontradas, preferencialmente, na submucosa do trato gastrointestinal, pele e peritônio (Welle, 1997). Imuno-histoquimicamente, os mastócitos podem ser identificados de acordo com o tipo de protease predominante: protease de mastócito de rato I (RMCP-I) no caso de CTMCs ou RMCP-II quando se tratar de MMCs (Kawakubo *et al.*, 2005).

A desgranulação dos mastócitos pode ocorrer experimentalmente pela ação do composto 48/80, agente não imunogênico utilizado em experimentos para desgranulação de CTMCs (Matsumoto *et al.*, 2004; Ohta *et al.*, 2006). Nesses experimentos, os MMCs permanecem inalterados (Galli & Nakae, 2003). O processo de desencadeamento da desgranulação dos CTMCs não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que o composto 48/80 ativa proteínas ligantes GTP dos mastócitos (Kuno *et al.*, 1993; Palomaki & Laitinen, 2006).

A exposição aguda ou crônica ao etanol tem mostrado ter efeitos prejudiciais na defesa do organismo, diminuindo a capacidade de atuar contra doenças infecciosas e reduzindo a capacidade do sistema imune em rejeitar tumores (Carvalho *et al.*, 2005). Não está claro se o etanol age diretamente sobre os mastócitos ou induz a liberação de algum outro fator ativador de mastócito, como a substância P ou o peptídeo intestinal vasoativo (Toiavari *et al.*, 2000). Em camundongos tratados com etanol, ocorreu a inibição da produção de citocinas inflamatórias por macrófagos alveolares, a produção de TNF- α e a desgranulação induzida por Ig-E (Toiavari *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005). A clara diminuição da liberação de mediadores pelos mastócitos, em particular TNF- α e IL-8, pode resultar no atenuado recrutamento de neutrófilos e, em parte, explicar a deficiência imune conhecida associada com o consumo crônico de etanol (Toiavari *et al.*, 2000), contribuindo para a instalação de alterações patológicas no organismo (Szabo, 1999).

Pesquisas recentes sobre alcoolismo têm enfatizado a importância do estudo dos mastócitos em tecidos do sistema genital tanto feminino quanto masculino. Gosden *et al.* (1993) propôs que as proteases RMCP-I e II contribuem para a remodelação da matriz extracelular do ovário, atuando no crescimento folicular e do corpo lúteo e regressão do útero durante o ciclo estral e prenhez. Acredita-se que o consumo crônico de etanol exerça influência na instalação ou evolução do processo inflamatório ou em ambos (Chuffa *et al.*, 2009). Mastócitos na medula ovariana de ratas UChA foram descritos por Chuffa *et al.* (2009), sugerindo ação indireta dos efeitos tóxicos do etanol. Mello Júnior *et al.* (1997) notaram infiltração de mastócitos na parede vesical de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental, além do aumento da sensibilidade às inflamações.

Em humanos, essas afirmações assemelham-se às encontradas por Collan *et al.* (1976) que observaram mastócitos no epitélio da bexiga urinária de pacientes com cistite intersticial. Ambos os dados estão em conformidade com os achados clínicos de Stopinski *et al.* (1993) de que há maior risco de se contrair infecções urinárias em pacientes que consomem etanol. Em situações fisiológicas normais, mastócitos podem ser vistos no testículo de homens adultos (Yamanaka *et al.*, 2000), indicando possível função na produção de esteróides (Meineke *et al.*, 2000). Em casos de infertilidade, há aumento no número de mastócitos nos testículos (Meineke *et al.*, 2000), onde ativam fibroblastos, promovendo a síntese de colágeno, causando a fibrose do órgão (Yamanaka *et al.*, 2000). Além disso, o aumento da quantidade de mastócitos na próstata foi confirmado também em pacientes com carcinoma prostático (Aydin *et al.*, 2002).

Justificativa

Na literatura científica especializada, não há relatos de pesquisas experimentais que avaliam os efeitos tóxicos do consumo crônico de etanol sobre a população de mastócitos em tecidos hormônios-dependentes do sistema genital masculino. No entanto, são conhecidos outros efeitos tóxicos do etanol no sistema genital masculino, como estresse oxidativo, apoptose e morte celular (Novelli *et al.*, 1997; Husain & Somani, 1998; Koh & Kim, 2006). Assim, trabalhos sobre os efeitos inflamatórios do etanol no sistema genital masculino, com ênfase na variação do número de mastócitos no lobo ventral da próstata, no epidídimo e no testículo de ratos da linhagem UChB (bebedores voluntários de grande quantidade de etanol a 10%) são pertinentes.

Objetivos

- Analisar histológica e quantitativamente os mastócitos no lobo ventral da próstata, no epidídimo e no testículo, usando o modelo experimental de ratos UChB (modelo de alcoolismo), bebedores voluntários de etanol a 10%, e como controle UChB e Wistar (sem administração de solução de etanol);
- Avaliar se há interação do número de mastócitos frente à ingestão de etanol nos órgãos estudados.

Artigo

O presente trabalho originou um artigo que está sendo preparado para submissão ao periódico *Asian Journal of Andrology*, o qual se intitula “Mastócitos e etanol: interações na

próstata, no epidídimo e no testículo de ratos UChB (consumidores voluntários de etanol a 10%)”, e que será apresentado a seguir.

Artigo

“Mastócitos e etanol: interações na próstata, no epidídimo e no testículo de ratos UChB (consumidores voluntários de etanol a 10%)”

Leonardo O. Mendes¹, João Paulo A. Amorim¹, Giovana R. Teixeira², Luiz Gustavo A. Chuffa¹, Beatriz A. Fioruci¹, Tatiana A. Pimentel³, Wilson de Mello Junior², Carlos R. Padovani⁴, Sergio Pereira², Marcelo Martinez⁵, Patrícia F. F. Pinheiro², Sônia M. Oliani³, Francisco Eduardo Martinez²

1 – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

2 – Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo – UNESP

3 – Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual de São Paulo – UNESP

4 – Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP

5 – Departamento de Morfologia, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR

Agência Financiadora: CAPES e FAPESP

Endereço do autor:

Francisco Eduardo Martinez

Departamento de Anatomia

Instituto de Biociências de Botucatu

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Caixa-Postal 510

CEP 18618-000, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP – Brasil

E-mail: martinez@ibb.unesp.br

Tefone: +55 (14) 38116040, Fax: +55 (14) 38116264

Running Title: Etanol e mastócitos

Mastócitos e etanol: interações na próstata, no epidídimo e no testículo de ratos UChB (consumidores voluntários de etanol a 10%)

Resumo

O alcoolismo tem atingido proporções alarmantes em todo o mundo, porém são escassas as investigações sobre o efeito inflamatório do etanol nos órgãos reprodutivos. O mastócito é uma das principais células envolvidas nos processos inflamatórios, com a presença de dois subtipos em roedores, de tecido conjuntivo (CTMC) e de mucosa (MMC). Portanto, o objetivo do trabalho é localizar e quantificar os mastócitos no lobo ventral da próstata, no epidídimo e no testículo de ratos UChB e avaliar se há interação do etanol com o número de mastócitos nos órgãos analisados. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (n=10/grupo): UChB com administração de etanol a 10% (UChBet), UChB sem administração de etanol (UChBco) e Wistar (W). Amostras do lobo ventral da próstata, do testículo e do epidídimo direitos foram coletadas após 180 dias de experimentação e processadas para análise em microscopia de luz. O material foi corado com azul de toluidina para identificação dos mastócitos totais, além de imunohistoquímica para identificação dos CTMC. Maior número de mastócitos e de células desgranuladas foram encontradas nos animais consumidores de etanol, acompanhado por maior proporção de MMC nos animais UChB. Conclui-se que o etanol aumenta o número de mastócitos desgranulados e de MMC e, conseqüentemente, pode desencadear processos inflamatórios na próstata, epidídimo e testículo de ratos UChB.

Palavras chave: ratos, lobo ventral da próstata, testículo, epidídimo, etanol, mastócitos.

Lista de abreviaturas

Mastócitos de mucosa (MMC)

Mastócitos de tecido conjuntivo (CTMC)

Protease de mastócito do tipo I (RMCP-I)

Protease de mastócito do tipo II (RMCP-II)

Grupo UChB com administração de etanol (UChBet)

Grupo UChB sem administração de etanol (UChBco)

Grupo Wistar (W)

Introdução

O etanol é caracterizado por causar distúrbios em vários sistemas orgânicos,¹ tanto em humanos, macacos como em roedores.² Em busca do caráter genético do alcoolismo, foram selecionados na Universidade do Chile, a partir de cruzamentos *inbreeding* de ratos Wistar, os animais UChA e UChB, de baixo e alto consumo de etanol, respectivamente. Os alelos que induzem o alcoolismo são naturalmente transmitidos durante a fusão dos gametas e modulam a preferência ou a tolerância ao consumo de etanol.³ As linhagens UCh são consideradas puras para estudos dos efeitos do etanol.

A literatura especializada enfatiza o efeito do consumo de etanol no sistema genital masculino de animais de laboratório.^{4,5,6} Alterações na histologia testicular foram verificadas nos ratos UChA e UChB, como desorganização epitelial, vacuolização, aumento do número de gotas lipídicas no citoplasma das células de Sertoli e perda de elementos germinativos.⁴ O epidídimo mostrou alterações significativas, principalmente no segmento caudal, onde foi verificada atrofia do epitélio devido a diminuição da área citoplasmática,⁴ além do comprometimento na maturação dos espermatozoides.⁷ Atrofia do epitélio secretor,⁸ além da presença de neoplasia intraepitelial prostática e de células inflamatórias,⁵ foram descritas no lobo ventral da próstata de ratos UChA e UChB.

Apesar da avaliação sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino, poucos trabalhos dão atenção ao processo inflamatório desencadeado pelos efeitos do etanol. O mastócito, uma das principais células inflamatórias, contém ou sintetiza sobre estímulos apropriados, potentes mediadores biologicamente ativos que podem ter efeitos diferentes na inflamação, na remodelação de tecidos,⁹ na fibrose, na defesa contra doenças infecciosas, na

angiogênese e na biologia do câncer.^{10,11} Estudos em roedores permitiram a identificação de dois subtipos de mastócitos: de tecido conjuntivo (CTMC) e de mucosa (MMC).¹² Além das diferenças morfológicas e funcionais,^{13,14} se caracterizam por diferentes tipos de proteases: protease de mastócito do tipo I (RMCP-I), característica dos CTMCs e RMCP-II de MMCs.¹⁵

Mastócitos foram extensivamente estudados em fêmeas, relacionando-os com as diversas fases do ciclo estral.^{16,17,18,19} Diferentemente das fêmeas, há poucos trabalhos relacionando os mastócitos e o sistema reprodutor masculino. Gaytan *et al*²⁰ verificaram aumento na quantidade de mastócitos testiculares em ratos após tratamento neonatal com estrógeno, sem diferenças significativas na próstata e no epidídimo.

Acredita-se que o consumo crônico de etanol exerça influência na instalação ou na evolução do processo inflamatório ou em ambos. O etanol provocou aumento dos mastócitos na medula ovariana de ratas UCh,²¹ porém não há dados dos efeitos no sistema genital masculino. Assim, objetivou-se avaliar histológica e quantitativamente os mastócitos e verificar se há interação no número de mastócitos frente à ingestão de etanol no lobo ventral da próstata, epidídimo e testículo.

Materiais e Métodos

Animais e manejo experimental

Foram utilizados 20 ratos da linhagem UChB (consumidores voluntários de etanol a 10%) provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *Campus* de Botucatu (IBB/UNESP) e 10 ratos da linhagem Wistar cedidos pelo Biotério Central do *Campus* de Botucatu. Os animais

constituíram três grupos: 1º) ratos UChB com administração de solução de etanol a 10% (UChBet), 2º) ratos UChB sem administração de solução de etanol a 10% (controle - UChBco) e 3º) ratos Wistar sem administração da solução de etanol a 10% (controle - W). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (40X30X15cm), com fundos sólidos, forradas com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro), temperatura (20 à 25°C), sendo fornecida água filtrada e ração (Nuvital®) *ad libitum*. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Fixação, processamento e inclusão

Com 180 dias de idade, os machos foram sacrificados por decapitação e, em seguida, realizada a laparotomia abdômino-pélvica e o lobo ventral da próstata, o epidídimo e o testículo foram retirados e pesados em balança analítica. Os fragmentos do lobo ventral da próstata, do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda) e do testículo foram fixados em paraformaldeído a 4%, tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, durante 24h a 4°C. Após lavagem no mesmo tampão, os fragmentos dos tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em paraplástico (Oxford Labware, St. Louis, USA).

Análise em microscopia de luz

Histoquímica. Os mastócitos foram identificados pela coloração com azul de toluidina em solução de bórax a 1% (TAAB Laboratories, UK). A metacromasia, resultante da coloração por corantes básicos, permitiu avaliar e quantificar os mastócitos intactos e desgranulados.

Mastócitos intactos e desgranulados foram diferenciados pela ausência ou presença, respectivamente, de grânulos metacromáticos no exterior dos mastócitos, no tecido conjuntivo circundante, como descrito por Marón *et al*²² e Keith *et al*²³. Os cortes foram semi-seriados de quatro micrômetros (μm) de espessura obtidos no micrótomo Leica RM 2165. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Axiophot II - Zeiss do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE/UNESP.

Imunohistoquímica. Para detectar e quantificar os CTMC, secções de quatro μm dos fragmentos do lobo ventral da próstata, do epidídimo e do testículo adjacentes às coradas por azul de toluidina foram preparados em lâminas silanizadas (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma), desparafinizadas e hidratadas. Posteriormente, as lâminas foram levadas ao: (a) microondas em solução de citrato de sódio, pH 6,0, por 15 minutos; (b) esfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos; (c) bloqueadas com solução de peroxidase (3% H_2O_2 em metanol) por 15 minutos; (d) lavadas três vezes em solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,4) por cinco minutos cada; (e) bloqueadas as proteínas em solução de soro fetal bovino (BSA, 3% em PBS) por 1 hora; (f) incubadas durante a noite em geladeira com o anticorpo primário monoclonal *mast cell protease 1*, anti-RMCP-1 (Imuny Biotechnology, BRA), característicos dos CTMC, diluição de 1:400 em BSA a 1% em PBS; (g) lavadas três vezes em PBS (5 minutos cada), incubadas com o anticorpo secundário *rabbit* anti-mouse (DAKO, USA), biotilado (diluição 1:100 em PBS) por uma hora; (h) lavadas três vezes em PBS (5 minutos cada); (i) incubadas com complexo Avidina-Biotina (DAKO, USA) por 45 minutos; (j) lavadas três vezes em PBS (5 minutos cada); incubadas em DAB (Sigma-Aldrich, Alemanha) por dois minutos; (k) lavadas em água destilada, contra coradas com hematoxilina de Harris e montadas com *PermOUNT*®.

Todos os fragmentos processados foram analisados e fotografados no fotomicroscópio Axiophot II - Zeiss do Laboratório de Anatomia do IBB/UNESP.

Quantificação dos mastócitos e análise estatística

A quantificação foi realizada através das lâminas de histoquímica e imunohistoquímica. Os valores foram demonstrados em células/mm² de oito cortes semi-seriados de quatro µm (deixando 50 µm de espaço entre cada secção) por bloco (dez blocos/ grupo). A contagem no lobo ventral da próstata foi feita em quatro campos/corte observados em objetiva de 40X, totalizando a área de 0,34mm². Oito cortes seriados/bloco foram varridos na sua totalidade em objetiva de 40X no epidídimo e no testículo. As análises no lobo ventral da próstata e no epidídimo foram feitas através da análise de variância para o modelo com um fator, complementado com as comparações múltiplas de Tukey.²⁴ No testículo, foi realizado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com comparações múltiplas de Dunn.²⁴ Ambas as análises com 5% de significância. O número estimado de MMC correspondeu à diferença entre o valor total de mastócitos e o número de CTMC, resultado da imunohistoquímica para RMCP-I.

Resultados

Os mastócitos apresentaram localização semelhante nos diferentes grupos experimentais. Foram encontrados principalmente no estroma, em torno de vasos sanguíneos ou próximos ao epitélio no lobo ventral da próstata. Os mastócitos testiculares estavam presentes junto à túnica albugínea em torno dos vasos subcapsulares. Semelhante à próstata, os mastócitos do epidídimo

foram constantes no estroma, próximos ao epitélio ou em torno de vasos sanguíneos, além de algumas células encontradas no interior da cápsula de tecido conjuntivo que envolve o órgão.

A quantidade de mastócitos variou entre os grupos nos diferentes órgãos. O lobo ventral da próstata apresentou maior número de mastócitos desgranulados/mm² no grupo UChBet (Figura 1A-B, D-E, G-H). As células intactas não apresentaram diferença estatística significativa entre os três grupos experimentais. O etanol aumentou a quantidade total de mastócitos no lobo ventral da próstata (Tabela 1).

O testículo não apresentou diferenças no número de mastócitos entre os grupos experimentais (Tabela 1). Além disso, os mastócitos estavam presentes em menor número quando comparados à próstata e ao epidídimo (Tabela 1, Figura 2A, C, F).

Os animais da linhagem Wistar mostraram maior número de mastócitos intactos/mm² no epidídimo (Tabela 1). Apesar de não apresentar diferença estatística significativa, o grupo UChBet apresentou tendência de aumento na quantidade das células desgranuladas (Tabela 1). Essa tendência refletiu-se no número total de mastócitos/mm² maior no grupo UChBet (Figura 3A-D).

A análise do epidídimo foi realizada também nas suas diferentes regiões, revelando diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (Tabela 2). Menor número de mastócitos intactos/mm² foi observado no segmento inicial do epidídimo dos ratos UChBco, enquanto que na região da cabeça do epidídimo dos ratos Wistar maior número/mm² (Tabela 2). Com relação às células desgranuladas, o grupo UChBet apresentou maior número em todas as regiões, com exceção da região da cabeça onde não foi significativo (Figura 3A-D).

A quantificação dos CTMC na próstata apresentou maior número deste subtipo celular/mm² nos animais consumidores de etanol (Tabela 3; Figura 1C, F, I), fato este devido ao

grande número de mastócitos presente neste órgão nos animais UChBet. A partir do número CTMC/mm², podemos inferir a quantidade de MMC, sabendo que estes correspondem aos dois subtipos de mastócitos presentes em roedores. A partir dos números obtidos podemos notar maior quantidade de MMC no grupo UChBet, sendo que os animais do grupo Wistar apresentaram número reduzido em relação aos outros dois grupos (Tabela 3).

No testículo houve maior quantidade de CTMC nos animais do grupo W em relação ao UChBco (Tabela 3). Os animais deste último grupo apresentaram pouca marcação para CTMC e, portanto, maior número de MMC será encontrado no testículo destes animais. Os animais UChBet também apresentaram número reduzido de CTMC, porém tal resultado não foi estatisticamente significativo quando comparado aos animais W (Tabela 3 e Figura 2B, D, F).

A análise do epidídimo, assim como no testículo, apresentou maior número de CTMC/mm² no W, em relação à linhagem UChB, tanto nos animais controles como aqueles com ingestão de etanol (Tabela 3). Em todos os grupos houve pouca marcação para CTMC no epidídimo, o que nos permite concluir que tal órgão apresenta maior quantidade de MMC (Tabela 3 e Figura 6E-G).

Discussão

O etanol não alterou a localização dos mastócitos nos órgãos analisados. Os mastócitos encontraram-se distribuídos pelo estroma fibromuscular e em torno dos vasos sanguíneos na próstata. Segundo Gaytan *et al*²⁰, o tratamento neonatal com esteróides em ratos também não modificou a localização dos mastócitos prostáticos. O mesmo padrão foi verificado em homens com câncer de próstata e em pacientes saudáveis, havendo apenas discreto aumento em torno do

epitélio glandular.²⁵ O epidídimo também apresentou mastócitos no estroma, em torno dos vasos sanguíneos ou próximos ao epitélio. Distribuição similar é encontrada em humanos e roedores, independente da condição ou tratamento experimental.^{20,26}

Diferentemente da próstata e do epidídimo, os mastócitos testiculares possuem localização diferenciada entre humanos e roedores. Os mastócitos testiculares humanos localizam-se pelo interstício e túnica albugínea, diferindo de roedores que se encontram próximos à túnica albugínea, preferencialmente em torno de vasos sanguíneos.²⁷ Os mastócitos testiculares dos ratos UChB mantiveram a localização padrão para roedores. Ao contrário do etanol, grupos tratados na fase neonatal com estradiol apresentaram grande quantidade de mastócitos no interstício testicular devido à ação direta do esteróide sobre os mastócitos.²⁰ Em casos de infertilidade humana, mastócitos encontram-se próximos à lâmina própria da túnica albugínea, secretando fatores quimiotáticos para fibroblastos e, conseqüentemente, provocando aumento da parede tubular.^{28,29}

A próstata normal constitui microambiente rico em mastócitos e o tratamento com esteróides, tanto estrógenos como andrógenos, não alterou esse padrão.²⁰ O etanol parece ter efeito diferente dos esteróides sobre os mastócitos, pois aumentou a quantidade de mastócitos/mm², além das células desgranuladas, na próstata ventral de ratos UChB. Morón *et al*²² verificaram aumento de mastócitos, tanto intactos como desgranulados, no lobo ventral da próstata de ratos com prostatite experimental.

Em humanos, o aumento da densidade de mastócitos verificada em casos de câncer de próstata caracteriza-se por proteção contra o tumor,³⁰ relacionando-se a favorável fenótipo tumoral e bom prognóstico.³¹ Além disso, o aumento da desgranulação dos mastócitos é comum

nos últimos estágios da proliferação do câncer de próstata³² e os produtos liberados, histamina, serotonina e heparina, relacionados à inibição do tumor.³⁰

O etanol, por si só, é potente modulador do sistema imune, estando os indivíduos alcoólicos crônicos mais suscetíveis a infecções por variedade de patógenos e com o aumento do risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer.³³ Devido à diversidade de mediadores liberados e a capacidade de recrutar outras células, os mastócitos são importantes participantes das respostas inflamatórias.²²

Mastócitos estão presentes em testículos normais de humanos e roedores. Sugere-se que os seus produtos, como histamina e serotonina, seriam os responsáveis pela esteroidogênese testicular em roedores²⁹ e controle do fluxo sanguíneo.²⁰ A ingestão de etanol não alterou a quantidade nem o número de células desgranuladas no testículo, diferentemente do estradiol que promoveu seu aumento.²⁰ Gaytan *et al*³⁴ propuseram equilíbrio na relação entre mastócitos e células de Leydig, baseado no fato de que ratos que tiveram destruição das células de Leydig apresentaram acúmulo de mastócitos no interstício testicular.

Diversos trabalhos relacionam a existência de casos de infertilidade humana e espermatogênese anormal com aumento dos mastócitos testiculares.^{29,35,36} A secreção dos mastócitos estimula a proliferação de fibroblastos tendo papel chave na fibrose e espessamento da parede dos túbulos seminíferos, característica histológica comum encontrada nos casos de infertilidade masculina.^{27,37}

O epidídimo apresenta menor número de mastócitos que outros órgãos,³⁸ porém em quantidade maior que o testículo,²⁶ semelhante aos dados obtidos no presente trabalho. Nistal *et al*²⁶ estabeleceram que os mastócitos são mais numerosos na cabeça e cauda do epidídimo. Porém, quando se estipula o número de células/mm², como demonstrado neste trabalho, o maior

número verificado nas regiões da cabeça e cauda dilui-se, pois possuem maior área que o corpo epididimário.

O maior número de mastócitos encontrado no epidídimo de ratos alcoólicos difere dos resultados apresentados por Gaytan *et al*²⁰. Mastócitos epididimários são fonte de serotonina que atua na maturação espermática através da modulação local da temperatura, distribuição de nutrientes e suporte de alimentos, controlando a função vasomotora e epitelial, com especial atenção para as células neuroendócrinas.³⁹ O aumento do número total e de mastócitos desgranulados nos animais consumidores de etanol deve promover, conseqüentemente, maior liberação de serotonina, comprometendo as funções epididimárias.

As duas populações de mastócitos presentes em roedores, os CTMC e MMC diferem quanto às propriedades histoquímicas, proteases e citocinas, morfologia e susceptibilidade a drogas inibitórias.⁴⁰

Menor quantidade de CTMC foi verificada nos ratos UChB comparado ao Wistar nos três órgãos analisados. A análise da porcentagem de CTMC em relação ao total de mastócitos é menor no grupo UChBet no lobo ventral da próstata. Sabe-se que os únicos subtipos de mastócitos em roedores são os CTMC e MMC¹⁵ e, portanto, conclui-se que o aumento de mastócitos verificado nos animais UChBet corresponde aos MMC. Esse subtipo é migratório e tem tempo de meia-vida menor que os CTMC.⁴¹ Aumento de MMC foi também verificado em casos de regeneração hepática após remoção parcial do fígado⁴¹ e em infecções intestinais por helmintos.⁴²

A presença de um subtipo predominante de mastócitos é regulada por fatores ambientais e tecido-específica,⁴³ sendo que mudanças na população de mastócitos podem ocorrer em condições patológicas.¹⁰

Assim como em roedores, há diferentes subtipos de mastócitos em humanos, também classificados de acordo com o conteúdo de proteases: MC_T (contém somente triptase), MC_{TC} (contém tryptase e quimase em adição a outras proteases).⁴⁴ É possível estabelecer relação entre os subtipos de mastócitos de humanos e roedores, com MC_T assemelhando-se aos MMC e MC_{TC} próximos aos CTMC.⁴⁵ Observações de Yamanaka *et al.*¹⁰ sugerem que o subtipo MC_{TC} está envolvido predominantemente em casos de fibrose e remodelação tecidual, enquanto que o MC_T relacionado a respostas alérgicas e inflamatórias.

É descrito pela literatura especializada que apesar da diminuição da concentração sérica e dos receptores testiculares de hormônio luteinizante, provocando diminuição da secreção de testosterona testicular, o que explicaria uma ação indireta do etanol, os efeitos diretos não devem ser descartados.⁴⁶ Nurmi *et al.*⁴⁷ relataram, em estudos *in vitro*, que o etanol aumenta a apoptose em mastócitos humanos. A diminuição no número de mastócitos não corroboraria com os dados apresentados no presente trabalho nem por Cagnon *et al.*⁴⁸, que ao submeter camundongos ao alcoolismo crônico não verificou apoptose nas células da próstata ventral, indicando que a morte celular programada não foi induzida pelo etanol.

Por alterar o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, diminuindo a concentração de testosterona, o etanol pode ser classificado como desregulador endócrino. A exposição à desreguladores endócrinos, como o fitalato, é responsável pelo aparecimento de focos inflamatórios e regiões hiperplásicas na próstata ventral de ratos.⁴⁹ Segundo Yatkin *et al.*⁵⁰, o desequilíbrio na relação andrógeno/estrógeno pode ser um dos fatores desencadeadores do processo inflamatório, semelhante a casos de obesidade e envelhecimento. Assim, o desequilíbrio hormonal causada pelo etanol poderia aumentar o processo de desgranulação dos mastócitos,

além do aumento de MMC, possibilitando o aparecimento de reação inflamatória nos órgãos analisados, assunto de investigações futuras a serem comprovadas.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer às agências CAPES e FAPESP (Procs. 2008/52722-1 e 2008/57222-7) pelo auxílio fornecido para execução deste trabalho.

Referências

1. Gomes IC, Cagnon VHA, Carvalho CAF, et al. Stereology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell* 2002; 34: 177-186.
2. Kim JH, Kim HJ, Noh HS, et al. Suppression by ethanol of male reproductive activity. *Brain Res* 2003; 989: 91-98.
3. Quintanilla ME, Israel Y, Sapag A, et al. The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addict Biol* 2006; 11: 310-323.
4. Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, et al. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J Submicrosc Cytol Pathol* 2000; 32: 175-184.
5. Cândido EM, Carvalho CAF, Martinez FE, et al. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biol Intern* 2007; 31: 459-472.
6. Martinez M, Macera S, de Assis GF, Pinheiro PF, et al. Structural evaluation of the effects of chronic ethanol ingestion on the testis of *Calomys callosus*. *Tissue Cell* 2009; 41: 199-205.
7. Srikant V, Malini T, Arunakaran J, et al. Effects of ethanol treatment on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 509-515.
8. Martinez FE, Laura IE, Martinez M, et al. Morphology of the ventral lobe of the prostate and seminal vesicle in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UChB). *J Submicrosc Cyto Pathol* 2001; 33: 99-106.
9. Galli SJ, Nakae S. Mast cells to the defence. *Nat Immunol* 2003; 4: 1160-1162.
10. Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, et al. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum Reprod* 2000; 15: 1543-1547.

11. Silistino-Souza R, Rodrigues-Lisoni FC, Cury PM, et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 2582-2589.
12. Damazo AS, Paul-Clark MJ, Straus AH, et al. Analysis of the annexin 1 expression in rat trachea. *Annexins* 2004; 1: 1 – 7.
13. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 233-245.
14. De Jonge F, Nassauw LV, Meir FV, et al. Temporal distribution of distinct mast cell phenotypes during intestinal schistosomiasis in mice. *Parasite Immunol* 2002; 24: 225-231.
15. Kawakubo K, Akiba Y, Andelson D, et al. Role of gastric mast cells in the regulation of central TRH analog-induced hyperemia in rats. *Peptides* 2005; 26: 1580-1589.
16. Gaytan F, Bellido C, Aceitero J, et al. Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biol Reprod* 1991; 45: 27-33.
17. Gosden RG, Huntley JF, Douglas A, et al. Quantitative and cytochemical studies of mast cell proteases in rat ovaries and uteri in various reproductive states. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 577-582.
18. Aydin O, Tunçel N, Gürer, F, et al. Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats: cyclic changes and contribution to tissue histamine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998; 120: 255-262.
19. Reibiger I, Spänel-Borowski K. Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 243-249.
20. Gaytan F, Carrera G, Pinilla L, et al. Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *J Androl* 1989; 10: 351-358.

21. Chuffa GA, Padovani CR, Martinez FE. Ovarian structure and hormonal status of the UChA and UChB rats in response to ethanol. *Maturita* 2009; 62: 21-29.
22. Morón G, Maletto B, Orsilles M, et al. Age-related alteration in inflammatory response during experimental autoimmune prostatitis. *Mech Ageing Dev* 2000; 118: 71-85.
23. Keith IM, Jin J, Neal D, et al. Cell relationship in a Wistar rat model of spontaneous prostatitis. *J Urol* 2001; 166: 323-328.
24. Zar JH. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.
25. Bankl HC, Somarapoompichit P, Pikula B, et al. Characterization of human prostate mast cells and their increase in periprostatic vein thrombosis. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 97-106.
26. Nistal M, Santamaria L, Paniagua R. Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat* 1984; 119: 155-160.
27. Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev* 2006; 213: 66-81.
28. Jezek D, Banek L, Hittmair A, et al. Mast cells in testicular biopsies of infertile men with mixed atrophy of seminiferous tubules. *Andrologia* 1999; 31: 203-210.
29. Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, et al. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testis of infertile men. *Fertil Steril* 2000; 74: 239-244.
30. Nonomura N, Takayama H, Nishimura K, et al. Decreased number of mast cells infiltrating into needle biopsy specimens leads to a better prognosis of prostate cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 952-956.
31. Fleischmann A, Schlomm T, Köllermann J, et al. Immunological microenvironment in prostate cancer: high mast cell densities are associated with favorable tumor characteristics and good prognosis. *Prostate* 2009; 69: 976-981.

32. Aydin O, Dusmez D, Cinel L, et al. Immunohistological analysis of mast cells numbers in the intratumoral and peritumoral regions of prostate carcinoma compared to benign prostatic hyperplasia. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 267-271.
33. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol* 1999; 34: 830-841.
34. Gaytan F, Aceitero J, Lucena C, et al. Simultaneous proliferation and differentiation of mast cells and Leydig cells in the rat testis. Are common regulatory factors involved? *J Androl* 1992; 13: 387-397.
35. Kollur SM, Pattankar VL, El Hag IA. Mast cells in testicular lesions. *Ups J Med Sci* 2004; 109: 239-245.
36. Hussein MR, Abou-Deif ES, Bedaiwy MA, et al. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 2005; 83: 1447-1453.
37. Roaiah MMF, Khatab H, Mostafa T. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia* 2007; 39: 185-189.
38. Fritz F J, Pabst R. Numbers and heterogeneity of mast cells in the male genital tract of the rat. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 88: 360-362.
39. Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Queiroz DB, et al. Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. *J Androl* 2007; 28: 136-149.

40. Sant GR, Kempuraj D, Marchand JE, et al. The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis. *Urology* 2007; 69: 34-40.
41. Zweifel M, Breu K, Matozan K, et al. Restoration of hepatic mast cells and expression of a different mast cell protease phenotype in regenerating rat liver after 70%-hepatectomy. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 587-595.
42. Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1285-1291.
43. Noviana D, Mamba K, Makimura S, et al. Distribution, histochemical, and enzyme histochemical characterization of mast cell in dogs. *J Mol Histol* 2004; 35: 123-132.
44. Chen Z, Irani AA, Bradford TR, et al. Localization of rat tryptase to a subset of the connective tissue type of mast cell. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 961-969.
45. Crivellato E, Ribatti D. The fundamental contribution of William Bate Hardy to shape the concept of mast cell heterogeneity. *Br J Haematol* 2009; 15: 48-53.
46. Salonen I, Huhtaniemi, I. Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat. *Biol Reprod* 1990 ;42: 55-62.
47. Nurmi K, Methuen T, Mäki T, et al. Ethanol induces apoptosis in human mast cells. *Life Sci* 2009; 85: 678-684.
48. Cagnon VHA, Tomazini FM, Garcia PJ, et al. Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57B1/6J) submitted to chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell* 2001; 33: 354-360
49. Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, et al. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicol* 2009; 262: 215-223.

50. Yatkin E, Bernoulli J, Talvitie E, et al. Inflammation and epithelial alterations in the rat prostate: impact of androgen to oestrogen ratio. *Int J Androl* 2009; 32: 399-410.

Tabela 1. Número de mastócitos/mm² intactos, desgranulados, total e frequência de desgranulados (%) no lobo ventral da próstata, epidídimo e testículo, segundo as linhagens UChB e Wistar com ou sem ingestão de etanol. Valores expressos em média ± desvio-padrão no lobo ventral da próstata e epidídimo e mediana (mínimo; máximo) no testículo. Frequência de desgranulados (%) foi expressa em mediana (mínimo; máximo) em todos os órgãos.

Linhagens	Grupos	Lobo ventral da próstata			
		Mastócitos intacto/mm ²	Mastócitos desgranulados/mm ²	Total de mastócitos/mm ²	% desgranulados
UChB	Controle	16,76±4,83 ^a	28,45±6,55 ^{ab}	45,22±6,27 ^a	66,66 ^a (15,38;100)
	Etanol	18,16±5,77 ^a	46,25±16,75 ^b	64,41±16,98 ^b	71,54 ^a (31,25;100)
Wistar	Controle	12,21±8,65 ^a	17,50±6,97 ^a	29,71±7,02 ^a	56,34 ^a (0,00;100)
Testículo					
UChB	Controle	0,08 ^a (0,04;0,08)	0,04 ^a (0,03;0,09)	0,12 ^a (0,07;0,17)	43,07 ^a (0,00;100)
	Etanol	0,04 ^a (0,01;0,10)	0,06 ^a (0,01;0,15)	0,11 ^a (0,02;0,25)	56,69 ^a (0,00;100)
Wistar	Controle	0,03 ^a (0,00;0,05)	0,12 ^a (0,00;0,28)	0,16 ^a (0,00;0,32)	72,50 ^a (0,00;100)
Epidídimo					
UChB	Controle	0,39±0,08 ^a	1,47±0,27 ^a	1,88±0,36 ^a	78,70 ^a (60,83;89,81)
	Etanol	0,69±0,25 ^a	3,02±0,87 ^a	3,73±0,88 ^b	80,59 ^a (61,97;94,93)
Wistar	Controle	1,00±0,17 ^b	1,72±0,71 ^a	2,74±0,83 ^{ab}	62,12 ^b (39,72;80,61)

Letras minúsculas: comparação dos grupos. Letras iguais não diferem entre si e diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2. Número de mastócitos/mm² intactos e desgranulados nas diferentes regiões do epidídimo, segundo as linhagens UChB e Wistar com ou sem ingestão de etanol. Valores expressos em média \pm desvio-padrão.

Linhagens	Grupos	Mastócitos intactos			
		Inicial	Cabeça	Corpo	Cauda
UChB	Controle	0,23 \pm 0,09 ^a	0,41 \pm 0,17 ^a	1,36 \pm 0,29 ^a	0,33 \pm 0,09 ^a
	Etanol	0,98 \pm 0,39 ^b	0,46 \pm 0,25 ^a	1,69 \pm 0,7 ^a	0,51 \pm 0,23 ^a
Wistar	Controle	1,13 \pm 0,27 ^b	1,05 \pm 0,24 ^b	1,45 \pm 0,85 ^a	0,70 \pm 0,50 ^a
		Mastócitos desgranulados			
UChB	Controle	0,54 \pm 0,09 ^a	1,23 \pm 0,17 ^a	4,05 \pm 0,29 ^{ab}	2,55 \pm 0,09 ^a
	Etanol	3,16 \pm 0,39 ^b	1,94 \pm 0,25 ^a	6,11 \pm 0,71 ^b	3,88 \pm 0,23 ^b
Wistar	Controle	1,69 \pm 0,27 ^{ab}	1,48 \pm 0,24 ^a	2,90 \pm 0,85 ^a	1,92 \pm 0,50 ^a

Tabela 3. Número de CTMC/mm² no lobo ventral da próstata, epidídimo e testículo, segundo as linhagens UChB e Wistar com ou sem ingestão de etanol. Valores expressos em média \pm desvio-padrão no lobo ventral da próstata e epidídimo e mediana (mínimo; máximo) no testículo.

Linhagens	Grupos	Lobo ventral da próstata		
		Total de mastócitos/mm ²	CTMC/mm ²	Estimativa de MMC/mm ²
UChB	Controle	45,22 \pm 6,27 ^a	28,89 \pm 14,25 ^a	16,33
	Etanol	64,41 \pm 16,98 ^b	38,67 \pm 16,07 ^b	25,74
Wistar	Controle	29,71 \pm 7,02 ^a	24,19 \pm 10,71 ^a	5,52
Testículo				
UChB	Controle	0,127 ^a (0,078;0,178)	0,015 ^a (0,00;0,211)	0,112
	Etanol	0,118 ^a (0,029;0,259)	0,028 ^{ab} (0,00;0,314)	0,090
Wistar	Controle	0,163 ^a (0;0,326)	0,070 ^b (0,00;0,211)	0,093
Epidídimo				
UChB	Controle	1,88 \pm 0,36 ^a	0,01 \pm 0,02 ^a	1,86
	Etanol	3,73 \pm 0,88 ^b	0,38 \pm 0,14 ^b	3,35
Wistar	Controle	2,74 \pm 0,83 ^{ab}	0,64 \pm 0,27 ^c	2,09

Figura 1 – Mastócitos no lobo ventral da próstata de ratos UChB. Mastócitos intactos (setas) e desgranulados (cabeças de setas) no estroma corados com azul de toluidina. Sem ingestão de etanol (A-B), com ingestão de etanol (D-E) e Wistar (G-H). Imunohistoquímica para RMCP-I (C, F, I) revelando os CTMC (asterisco). V: vaso. Barras: A, D, G: 50 μm ; B, C, E, F, H, I: 10 μm .

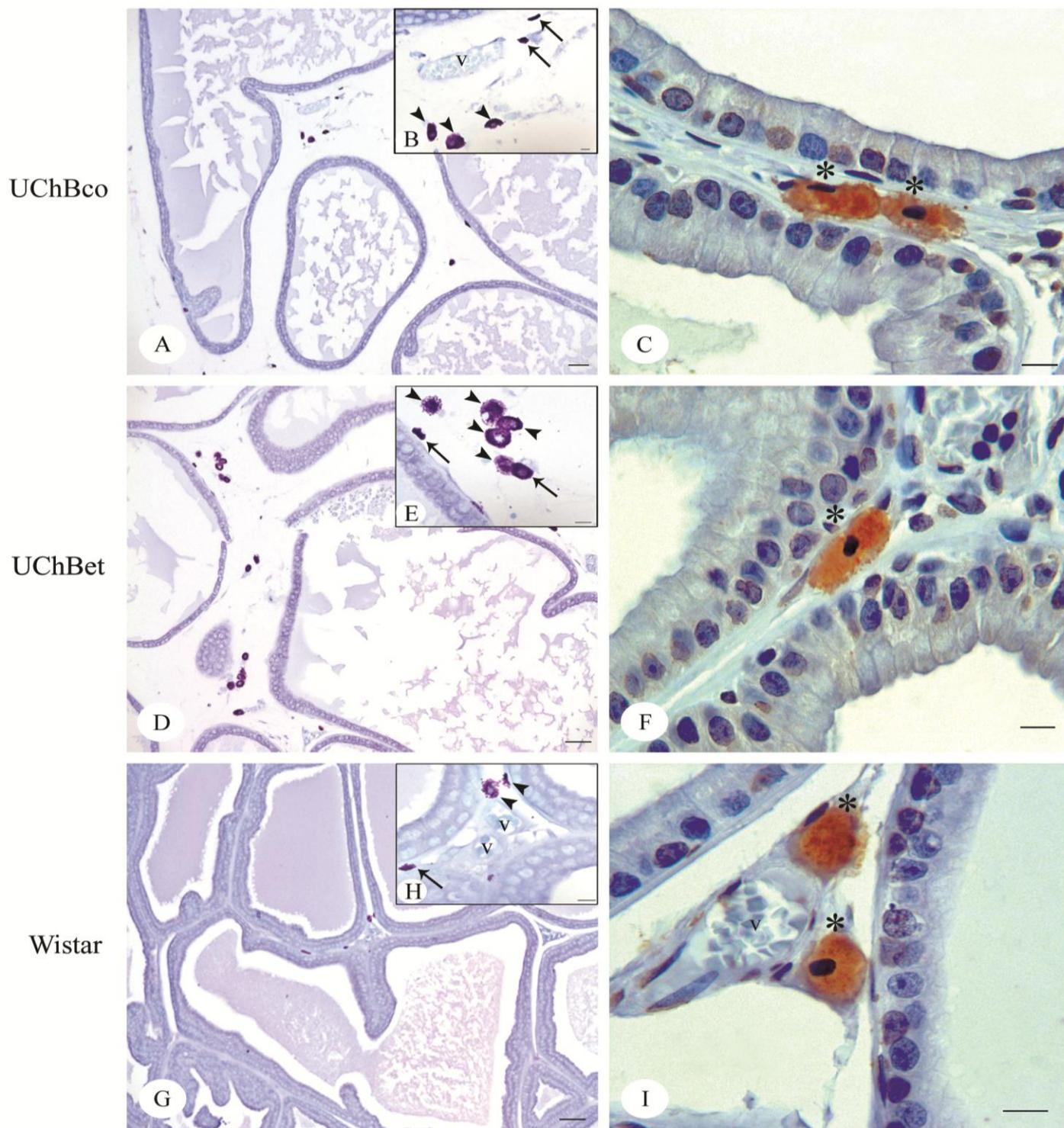
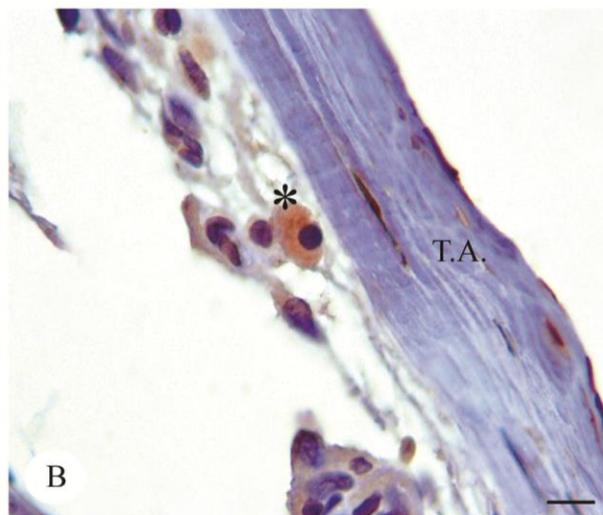
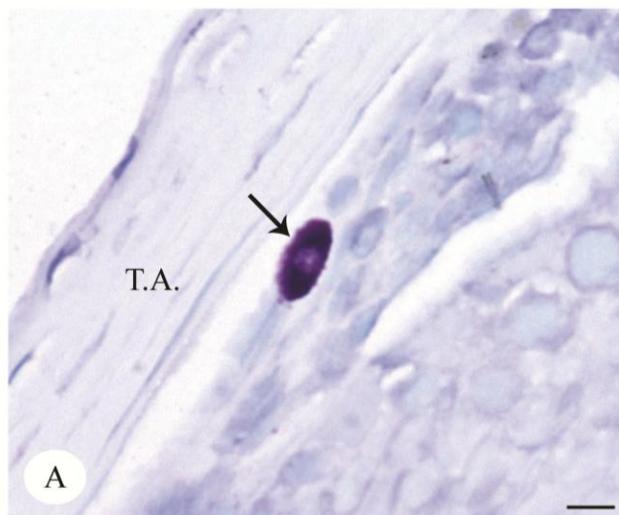
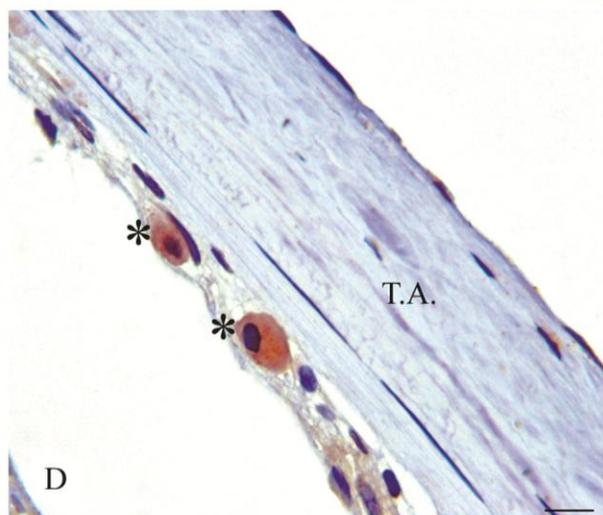
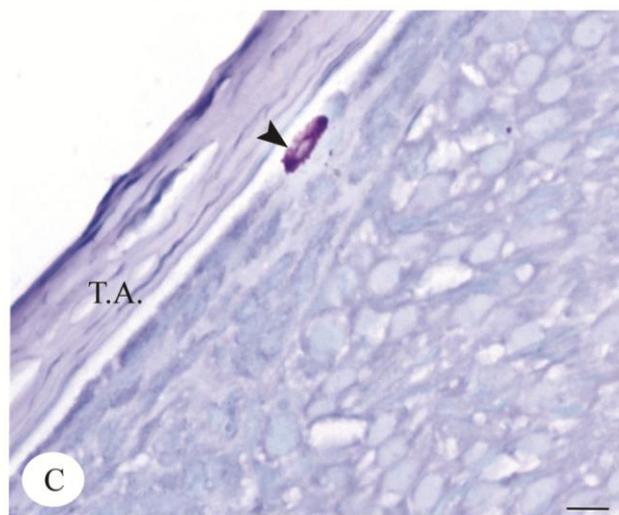


Figura 2 – Mastócitos no testículo de ratos UChB. Azul de toluidina (A, C, E) mostram mastócitos intactos (setas) e desgranulados (cabeças de setas) localizados profundamente à túnica albugínea nos animais UChB e Wistar. Imunohistoquímica para RMCP-I (B, D, F) revelando os CTMC. V: vaso; T.A.: túnica albugínea. Barras: 10 μ m.

UChBco



UChBet



Wistar

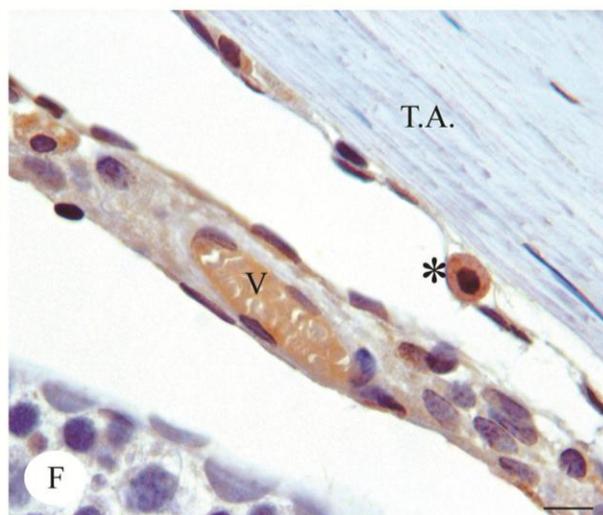
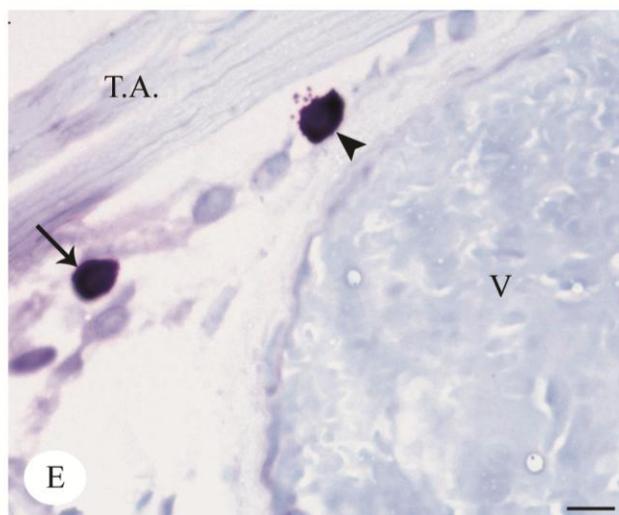
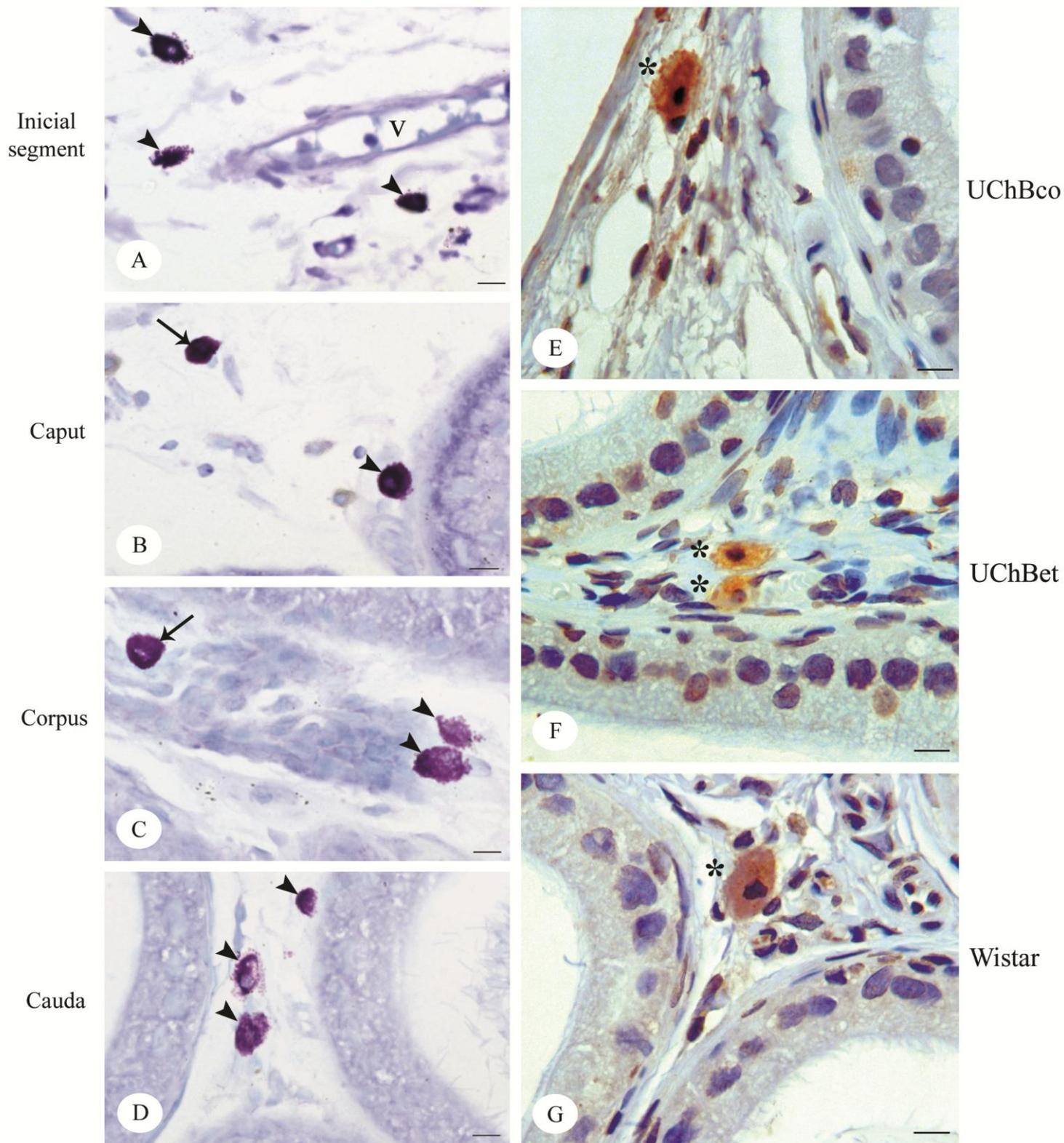


Figura 3 – Mastócitos localizados nas regiões do epidídimo de ratos UChB. Mastócitos intactos (setas) e desgranulados (cabeças de setas) corados com azul de toluidina foram observados nos segmentos inicial (A), cabeça (B), corpo (C) e cauda (D) do UChBet. Imunohistoquímica para RMCP-I mostra os CTMC no UChBco (E), UChBet (F) e Wistar (G). V: vaso. Barras: 10 μ m.



Conclusões Finais

O etanol aumenta o número de mastócitos desgranulados e de MMC e, conseqüentemente, pode desencadear processos inflamatórios na próstata, epidídimo e testículo de ratos UChB.

Referências da Introdução Geral

- . Adler, R.A. Clinically important effects of alcohol on endocrine function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 74, p. 957-960, 1992.
- . Anderson Jr., R.A.; Phillips, J.F.; Berryman, S.H.; Zaneveld, L.J. Ethanol-induced delayed male puberty in mice is not due to impaired Leydig cell function. *Reprod. Toxicol.*, v. 3, 101-113, 1989.
- . Anderson Jr., R.A.; Willis, B.R.; Oswald, C.; Zaneveld, L.J. Male reproductive tract sensitivity to ethanol: a critical overview. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 18, p. 305-310, 1983.
- . Aumüller, G. Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *The Prostate*, v. 4, p. 195-214, 1983.
- . Aumüller, G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat. Embryol.*, v. 179, 519-531, 1989.
- . Aydin, O.; Dusmez, D.; Cinel, L.; Doruk, E.; Kanik, A. Immunohistological analysis of mast cells numbers in the intratumoral and peritumoral regions of prostate carcinoma compared to benign prostatic hyperplasia. *Pathol. Res. Pract.*, vol. 198, p. 267-271, 2002.
- . Bannister, P.; Losowsky, M.S. Ethanol and hypogonadism. *Alcohol Alcohol.*, v. 22, p. 213-217, 1987.
- . Blomqvist, O.; Engel, J.A.; Nissbrandt, H.; Söderpalm, B. The mesolimbic dopamine-activating properties of ethanol are antagonized by mecamlamine. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 249, p. 207-213, 1993.
- . 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 Biol. Intern.*, v. 31, 459-472, 2007.

- . Carvalho, E.M.; Brito, G.A.C.; Pessoa, B.B.G.P.; Ribeiro, R.A.; Capaz, F.R. Long-term ethanol intoxication reduces inflammatory responses in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 38, p. 81-89, 2005.
- . Chuffa, G.A.; Padovani, C.R.; Martinez, F.E. Ovarian structure and hormonal status of the UChA and UChB rats in response to ethanol. *Maturitas*, v. 62, p. 21-29, 2009.
- . Clarke, P.B.S.; Fu, D.S.; Jakubovic, A. Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies locomotor stimulant action of nicotine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 246, p. 701, 1988.
- . Clermont, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol.*, v. 52, p. 198-236, 1972.
- . Collan, Y.; Alfthan, D.; Kivilaasko, E.; Oravisto, K.J. Electron microscopic and histological findings on urinary bladder epithelium in interstitial cystitis. *Eur. Urol.*, v. 2, p. 242-247, 1976.
- . Damazo, A.S.; Paul-Clark, M.J.; Straus, A.H.; Takahashi, H.K.; Perreti, M.; Oliani, S.M. Analysis of the annexin 1 expression in rat trachea. *Annexins*, v. 1, p. 1 – 7, 2004.
- . De Jonge, F.; Nassauw, L.V.; Meir, F.V.; Miller, H.R.P.; Marck, E.V.; Timmermans, J. Temporal distribution of distinct mast cell phenotypes during intestinal schistosomiasis in mice. *Parasite Immunol.*, v. 24, p. 225-231, 2002.
- . Di Sant’Agnese, P.A.; De Mesny Jensen, K.L. Myeloid bodies in endocrine-paracrine (neuroendocrine, APUD) cells: of the prostatourethral region. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 21, p. 557-564, 1989.
- . Edwards, G. & Gross, M.M. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. *Brit. Med. J.*, v. 1, p. 1058-1061, 1976.

- . Fávaro, W.J.; Cagnon, V.H. Immunolocalization of androgen and oestrogen receptors in the ventral lobe of rat (*Rattus norvegicus*) prostate after long-term treatment with ethanol and nicotine. *Int. J. Androl.*, v. 31, p. 609-618, 2008.
- . Fávaro, W.J.; Cagnon, V.H. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue Cell*, v. 38, 311-323, 2006.
- . Forchheimer, M.; Cunningham, R.M.; Gater, D.R.; Maio, R.F. The relationship of blood alcohol concentration to impairment severity in spinal cord injury. *J. Spinal Cord. Med.*, v. 28, p. 303-307, 2005.
- . Fortes, J.R.A. & Cardo, W.N. Alcoolismo. São Paulo, Savier, 1991.
- . Galli, S.J.; Maurer, M.; Lantz, C.S. Mast cells are sentinels of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 11, p. 53-59, 1999.
- . Galli, S.J.; Nakae, S. Mast cells to the defence. *Nat. Immunol.*, v. 4, 1160-1162, 2003.
- . Garro, A.J.; Lieber, C.S. Alcohol and cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 30, p. 219-249, 1990.
- . Gayotto, L.C.C.; Alves, V.A.F. Doenças do fígado e vias biliares. São Paulo: Atheneu, v. 2, p. 674-680, 2001.
- . Gomathi, C.; Balasubramanian, K.; Bhanu, N.V.; Srikanth. V.; Govindarajulu, P. Effect of chronic alcoholism on semen-studies on lipid profiles. *Int. J. Androl.*, v. 16, p. 175-181, 1993.
- . 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.

- . Gosden, R.G.; Huntley, J.F.; Douglas, A.; Inglis, L.; Miller, H.R.P. Quantitative and cytochemical studies of mast cell proteases in rat ovaries and uteri in various reproductive states. *J. Reprod. Fertil.*, v. 98, p. 577-582, 1993.
- . Grattagliano, I.; Vendemiale, G.; Errico, F.; Bolognino, A.E.; Lillo, F.; Salerno, M.T.; Altomare, E. Chronic ethanol intake induces oxidative alterations in rat testis. *J. Appl. Toxicol.*, v. 5, p. 307-311, 1997.
- . Grenhoff, J.; Aston-Jones, G.; Svensson, T.H. Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol. Scand.*, v. 128, p. 351, 1986.
- . Guess, H.A. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol. Rev.*, v. 23, p. 152-158, 2001.
- . Halsted, C.H.D. Nutrition an alcoholism liver disease. *Seminars in liver disease*, v. 24, p. 289-304, 2004.
- . Hazem, R.; Ismail, A.; Landry, F.; Aprikian, A.G.; Chevalier, S. Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *The Prostate*, v. 51, p. 117-125, 2002.
- . 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.
- . Hoyme, H.E.; May, P.a.; Kalberg, W.O.; Kodituwakku, P.; Gossage, J.P.; Trujillo, P.M.; Buckley, D.G.; Miller, J.H.; Aragon, A.S.; Khaole, N.; Viljoen, D.L.; Jones, K.L.; Robinson, L.K. A practical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics*, v. 115, p. 39-47, 2005.

- . Husain, K. & Somani, S.M. Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion in testicular antioxidant system in rat. *J. Appl. Toxicol.*, v. 18, p. 421-429, 1998.
- . Junqueira, L.C.U.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 540p.
- . Karaca, T.; Yörük, M.; Uslu, S. Distribution and quantitative patterns of mast cells in ovary and uterus of rat. *Arch. Med. Vet.*, v. 2, p. 135-139, 2007.
- . Kawakubo, K; Akiba, Y.; Andelson, D.; Guth, P.H.; Engel, E.; Taché, Y.; Kaunitz, J.D. Role of gastric mast cells in the regulation of central TRH analog-induced hyperemia in rats. *Peptides*, v. 26, 1580-1589, 2005.
- . Kitamura Y.; Matsuda H.; Hatanaka, k. Clonal nature mast cell clusters formed in W/W^v mice after bone marrow transplantation. *Nature*, v. 281, p. 154-155, 1979.
- . Koh, P.-O. & Kim, M.-O. Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testis. *J. Vet. Med Sci.*, v. 68, p. 1013-1017, 2006.
- . Koob, G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 13, p. 177-184, 1992.
- . Krulewitch, C.J. Alcohol consumption during pregnancy. *Annu. Rev. Nurs. Res.*, v. 23, p. 101-134, 2005.
- . Kucheria, K; Saxena, R.; Mohan, D. Semen analysis in alcohol dependence syndrome. *Andrologia*, v. 17, 558-563, 1985.
- . Kuno , M.; Kawawaki, J.; Shibata, T.; Gotani, H. Inhibitors of the arachidonic acid cascade dissociate 48/80-induced Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release in mast cells. *Am. J. Physiol.*, v. 264, p. 912-917, 1993.

- . Li, T.K.; Lumeng, L.; McBride, W.J.; Muypfi, J.M. Rodent lines selected for factors affecting alcohol solution. *Alcohol Alcohol.*, v. 1, p. 91-96, 1987.
- . Lieber , C.S.; De Carli, L.M. Ethanol dependence and tolerance: a nutritionally controlled experimental model in the rat. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.*, v. 6, p. 983-991, 1973.
- . Martinez, F.E.; Laura, I.E.; Martinez, M.; Padovani, C.R.; Bustos-Obregón, E. Morphology of the ventral lobe of the prostate and seminal vesicle in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 33, p. 99-106, 2001.
- . Martinez, F.E.; Martinez, M.; Padovani, C.R.; Bustos-Obregón, E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 32, p. 175-184, 2000.
- . Matsumoto, I., Inoue, Y., Tsuchiya, K, Shimada, T., Aikawa, T. Degranulation of mast cells located in median eminence in response to compound 48/80 evokes adrenocortical secretion via histamine and CRF in dogs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 287, p. 969-980, 2004.
- . Meineke, V.; Frungieri, M.B.; Jessberger, B.; Vogt, H.; Mayerhofer, A. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testis of infertile men. *Fertil. Steril.*, v. 74, 239-244, 2000.
- . Mello Júnior, W.; Garcia, P.J.; Cagnon, V.H.; Martinez, M.; Martinez, F.E. Morphologic changes in the vesical transition epithelium of alcoholic rats. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 29, p. 393-399, 1997.
- . Metcalfe, D.D.; Boyce, J.A. Mast cell biology in evolution. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 117, p. 1227-1229, 2006.

- . Moselhy, H.F.; Georgiou, G.; Kahn, A. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol Alcohol.*, v. 36, p. 357-368, 2001.
- . Novelli, E.L.B.; Rodriguez, N.L.; Santos, C.X.C.; Martinez, F.E.; Novelli, J.L.V.B. Toxic effects of alcohol intake on prostate of rats. *The Prostate*, v. 31, p. 37-41, 1997.
- . Noviana, D.; Kono, F.; Nagakui, Y.; Shimizu, H.; Mamba, K.; Makimura, S.; Horii, Y. Distribution and enzyme histochemical characterisation of mast cells in cats. *Histochem. J.*, v. 33, p. 597-603, 2001.
- . Noviana, D.; Mamba, K.; Makimura, S.; Horii, Y. Distribution, histochemical, and enzyme histochemical characterization of mast cell in dogs. *J. Mol. Histol.*, vol. 35, p. 123-132, 2004
- . O'Connell, H.; Lawor, B.A. Recent alcohol intake and suicidality – a neuropsychological perspective. *Ir. J. Med. Sci.*, v. 174, p.51-54, 2005.
- . Ohta, Y.; Kobayashi, T.; Imai, Y.; Inui, K.; Yoshino, J.; Nakasawa, S. Effect of oral vitamin E administration on acute gastric mucosal lesion progression in rats treated with compound 48/80, a mast cell degranulator. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 29, 675-673, 2006.
- . Palomaki, V.A.; Laitinen, J.T. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT1A receptors in rat brain sections. *Br. J. Pharmacol.*, v.147, p. 596-606, 2006.
- . Pereira, M.A.S.; Orsi, A.M.; Molinari, S.L.; Garcia, P.J. Alcohol effects on the principal and clear cells of the caput epididymis of albino rats. *Anat. Histol. Embryol.*, v. 32, p. 17-20, 2003.
- . Poschl, G.; Seitz, H.K. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.*, v. 39, p. 155-165, 2004.
- . Riley, E.P.; Thomas, J.D.; Goodlett, C.R.; Klintsova, A.Y.; Greenough, W.T.; Hungund, B.L.; Zhou, F.; Sar,i Y.; Powrozek, T.; Li, T.K. Fetal alcohol effects: mechanisms and treatment. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 25, p. 110-116, 2001.

- . Robaire, B.; Hermo, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. *In: Knobil, E.; Neill, J.D. The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, p. 999-1080, 1998.
- . Rodrigues, J.A., Favaretto, A.L.V., 1999. *Sistema reprodutor*. In: M.M. Aires, *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 877-917.
- . Ross, M. H.; Kaye, G.I.; Pawlina, W. *Histology: a text and atlas*. 4ed. Ed. LWW, cap. 21, 682-724, 2003.
- . Roy-Burman, P.; Wu, H.; Powell, W.C.; Hagenkord, J.; Cohen, M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer developmental. *Endocr. Relat. Cancer*, v. 11, p. 225-324, 2004.
- . Russell, L.D.; Ettlin, R.A.; Hikim, A.P.S.; Clegg, E.D. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, 1990.
- . Saxena, S.; Meehan, D.; Coney, P.; Wimalasena, J. Ethanol has direct effect inhibitory effects on steroidogenesis in human granulose cells: specific inhibition of LH action. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 14, p. 522-527, 1990.
- . Serre, V., Robaire, B. Segment-specific morphological changes in aging brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod.*, v. 58, p. 497-513, 1998.
- . Silistino-Souza, R.; Rodrigues-Lisoni, F.C.; Cury, P.M.; Maniglia, J.V.; Raposo, L.S.; Tajara, L.H.; Christian, H.C.; Oliani, S.M. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *Int. J. Cancer*, v. 120, p. 2582-2589, 2007.
- . Sokol, R.Z. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. *In: Sipes, G.; McQueen, C.A.; Gandolfi, A.J.; Comprehensive toxicology*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 87-98, 1997.

- . Srikant, V.; Malini, T.; Arunakaran, J.; Govindarajulu, P.; Balasubramanian, K. Effects of ethanol treatment on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 288, p. 509-515, 1999.
- . Stopinski, J.; Staib, I.; Weissbach, M. Influence of abuse of nicotine and alcohol on postoperative bacterial infection. *J. Chir.*, v. 130, p. 422-425, 1993.
- . Szabo, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol.*, v. 34, p. 830-841, 1999.
- . Tadic, S.D.; Elm, M.S.; Subbotin, V.M.; Eagon, P.K. Hypogonadism preceds liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. *Hepatology*, v. 31, p. 1135-1140, 2000.
- . Tampier, L.; Quintanilla, M.E.; Mardones, J. Acetaldehyde metabolism: differences between UChA and UChB rats. *Alcohol Alcohol.*, v. 29, p. 751-755, 1994.
- . Tirapelli, L.F. *Bases Morfológicas do corpo humano*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. 236p.
- . Toiavari, M.; Mäki T.; Suutarla, S.; Eklund, K.K. Ethanol inhibits IgE-induced degranulation and cytokine production in cultured mouse and human mast cells. *Life Sci.*, v. 67, p. 2795-2806, 2000.
- . Tortora, G.J.; Grabowski, S.R. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 1047p.
- . U.S. Department of Health, Education and Welfare. *Third special report to the U.S. Congress on alcohol and health from the Secretary of Health, Education and Welfare*. Rockville: NIAA, 1978.

- . Valchanov, K.P.; Proctor, G.B.; Hartley, R.H.; Paterson, K.L.; Shori, D.K. Enzyme histochemistry of rat mast cell tryptase. *Histochem. J.*, v. 30, p. 97-103, 1998.
- . Van Thiel, D.H. Ethanol-induced inhibition of testicular steroidogenesis in vitro: prevention by pyrazole. *Acta Med. Port.*, v. 4, p. 393-397, 1983.
- . Van Thiel, D.H.; Lester, R. Effects of chronic alcohol abuse on sexual function. *Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 8, p. 499-510, 1980.
- . Villata, J.; Balleca, J.L.; Nicolás, J.M.; Martínez de Osaba, M.J.; Antunes, E.; Pimentel, C. Testicular function in asymptomatic chronic alcoholism: relation to ethanol intake. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.21, p. 128-133, 1997.
- . Vittoria, A.; La Mura, E.; Cocca, T.; Cecio, A. Serotonin, somatostatin and chromagranin A-containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. *J. Anat.*, v. 171, p. 69-78, 1990.
- . Welle, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J. Leukoc. Biol.*, v. 61, p. 233-245, 1997.
- . Wise, R.A.; Rompre, P.P. Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.*, v. 40, p. 191-225, 1989.
- . Yamanaka, K.; Fujisawa, M; Tanaka, H; Okada, H.; Arakawa, S.; Kamidono, S. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum. Reprod.*, v. 15, p. 1543-1547, 2000.
- . Zhu, Q.; Meisinger, J.; Emanuele, N.V.; Emanuele, M. A.; LaPaglia, N.; Van Thiel, D. H. Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.*, v. 24, p. 1550-1556, 2000.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "Mastócitos no lobo ventral da próstata, no epidídimo e no testículo de ratos UChB (consumidores voluntários de etanol a 10%)":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: CEEA-IBB/UNESP, sob Protocolo(s) nº 52/08.

** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Leonardo de Oliveira Mendes
Aluno: Leonardo de Oliveira Mendes

Francisco Eduardo Martinez
Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Nome:

Função:

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO
Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **52/08-CEEA**, sobre "Mastócitos no corno uterino, no ovário, no lobo ventral da próstata e no testículo de ratos UChB", sob a responsabilidade de **FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de **08/08/2008**.

Botucatu, 8 de agosto de 2008.


Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA


NADIA JOVENCIO COTRIM
Secretária - CEEA