

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

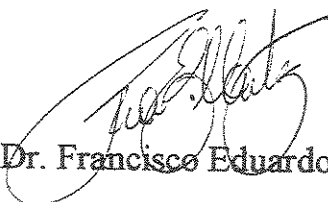
SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

CAMILA CONTIN DINIZ DE ALMEIDA-FRANCIA

**CICLO ESTRAL, HISTOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO
EPITÉLIO DA TUBA UTERINA DA LINHAGEM DE RATOS UChA E
UChB (BEBEDORES VOLUNTÁRIOS DE ETANOL)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
CAMILA CONTIN DINIZ
DE ALMEIDA-FRANCIA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Celular e Estrutural na área de
Anatomia.


Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
IBIO/CAMP

IIIDADE	BC
CHAMADA	T/UNICAMP
AL	64c
EX	65450
DMBO BC	16-86-05
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	31-8/05
1ª CPD	

Bib Id 363790

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Al64c

Almeida-Francia, Camila Contin Diniz de
Ciclo estral, histologia e ultra-estrutura do epitélio da
tuba uterina da linhagem de ratos UChA e UChB
(bebedores voluntários de etanol) / Camila Contin Diniz
de Almeida-Francia. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Francisco Eduardo Martinez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Estro. 2. Histologia. 3. Ultraestrutura. 4.
Tubas uterinas. 5. Rato. 6. Álcool. I. Francisco
Eduardo Martinez. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

Título em inglês: Estrous cycle, histology and ultrastructure of the uterine tube epithelium of UChA and UChB rats lineage (ethanol voluntary consumers).

Palavras-chave em inglês: estrus, histology, ultrastructure, uterine tube, rats, ethanol.

Área de concentração: Biologia celular e estrutural.

Titulação: Doutorado.

Banca examinadora: Francisco Eduardo Martinez, Maria Angelica Miglino, Maíra Aparecida Stefanini, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, Isabel Cristina Cherici Camargo.

Data da defesa: 17/06/2005.

Campinas, 17 de junho de 2005

BANCA EXAMINADORA

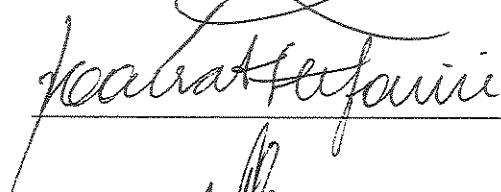
Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez



Profª. Drª. Maria Angelica Miglino



Profª. Drª. Máira Aparecida Stefanini



Profª. Drª. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



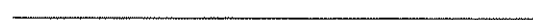
Profª. Drª. Isabel Cristina Cherici Camargo



Profª. Drª. Maria Julia Marques



Profª. Drª. Elisa Aparecida Gregório



200518846

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO

A Deus

“Amarás ao Senhor, teu Deus, de todo o teu coração, de toda a tua alma e de todo o teu entendimento. (...) Amarás ao teu próximo como a ti mesmo.”

Jesus Cristo

Aos meus queridos antepassados e, em especial, ao meu avô Gúido Contin (*in memorian*) por ensinar-me sempre a lutar pelos meus sonhos.

“Não há nada como o sonho para criar o futuro.”

Leonardo da Vinci

Aos meus amados pais, Geraldo Diniz de Almeida (*in memorian*) e Angela Contin Diniz de Almeida:

De vocês eu recebi o dom mais precioso: A Vida. Só por isso seria grata, mas ainda cultivaram na criança todos os valores que a transformaram numa jovem responsável e consciente. Trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus. Obrigada pelo sonho realizado, pela lição de amor que me ensinaram durante a vida.

“Os filhos nada podem fazer de si mesmos, senão somente aquilo que virem fazer os Pais; porque tudo o que estes fizerem, os filhos também semelhantemente o fazem. Porque os Pais amam os filhos, e lhes mostram tudo o que fazer.”

Ao meu marido Luis Alberto Domingo Francia Farje:

Agradeço a Deus pela pessoa maravilhosa que você é: amigo, carinhoso, dedicado, paciente, trabalhador, esforçado. Você compartilhou meu cansaço e preocupações, sempre me incentivando a prosseguir. Hoje, procuro palavras que fossem do meu coração para o seu. E só encontro umas poucas simples e sinceras: ***“Muchas gracias amor de mi vida!”***

Ao meu querido irmão Guido e demais familiares pelo apoio em todos os momentos.

DEDICO ESTE TRABALHO

Agradeço profundamente a Deus:

“Sagrado, Supremo, Infinito, Mente que permeia o Universo, Vida que permeia o Universo, Lei que permeia o Universo; Verdade, Luz, Sabedoria, Amor Absoluto – isto é a Grande Vida. Deus é o Todo de tudo. Todas as coisas são Mente de Deus, tudo é Palavra de Deus; tudo é Espírito, tudo é Mente; nada há que seja feito de matéria.”

Trechos da Sutra Sagrada Chuva de Néctar da Verdade

Respeitosamente junto as mãos e curvo-me diante do Onipotente. Muito obrigada!

“Estamos começando a conceber a relação entre a ciência e a religião de um modo totalmente diferente da concepção clássica.

Afirmo com todo o vigor que a religião cósmica é o móvel mais poderoso e mais generoso da pesquisa científica.”

(Albert Einstein)

Ao Prof. Francisco pela orientação, paciência e, principalmente, pela confiança. Meus sinceros agradecimentos.

“Treinar o espírito, desenvolver o senso crítico, a independência mental, o amor à Verdade, tendo sempre em vista o bem da humanidade – este deve ser o fundamento máximo da educação.”

Aos demais componentes da Comissão Examinadora Profas. Dras. Maria Angelica Miglino, Maíra Aparecida Stefanini, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, Isabel Cristina Cherici Camargo, Maria Júlia Marques e Elisa Aparecida Gregório por terem aceitado o convite para participarem da minha banca, pelas importantes correções, sugestões e incentivos.

“A instrução forma o caráter, mostra os deveres, inspira o amor à ordem, à justiça e às virtudes, origina o bom gosto em todas as coisas da vida.”

Diderot

- ✓ Ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, em especial ao Departamento de Anatomia pela concessão de dependência e aparelhos durante a realização desse trabalho.
- ✓ Aos animais por contribuírem, ainda que inconscientemente, para o desenvolvimento técnico e científico.
- ✓ À CAPS/DS e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 02/01817-6) pelo apoio na forma de bolsa de Doutorado e de bolsa de Auxílio à Pesquisa.
- ✓ Ao Prof. Dr. Francisco pelo fornecimento dos animais da linhagem UCh e ao Biotério Central IBB/UNESP pelo fornecimento dos animais do grupo controle.
- ✓ Aos amigos e funcionários do Biotério e do Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia IBB/UNESP, **Wanderley Thiago da Silva e Gelson Rodrigues** pela colaboração e auxílios no laboratório.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Coralina

- ✓ Ao amigo e funcionário do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia IBB/UNESP, **Ricardo Teixeira** pelo grande auxílio na técnica de historesina.
- ✓ Aos amigos e funcionários dos Laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da FMB/UNESP, **José Carlos Pedroso de Lima** e **Carlos César Ramos** pelo grande auxílio nas técnicas de fosfatase ácida e microscopia eletrônica.
- ✓ Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP pelo trabalho dedicado que desempenharam.
- ✓ À **Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas** por permitir a utilização do Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia IBB/UNESP, o qual possibilitou aos animais condições ideais de temperatura e luminosidade.

“Só teremos alegria se a repartirmos: a felicidade nasceu gêmea...”

Lorde Byron

- ✓ Aos **Profs. Drs. Carlos Roberto Padovani** e **Flávio Ferrari Aragon** pela interpretação dos dados estatísticos e pela construção dos gráficos e tabelas.
- ✓ À **Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus** pelas valiosas dicas, incentivo, apoio e amizade.

“O encanto da vida depende, unicamente, das boas amizades que cultivamos.”

Tarafa

- ✓ À **Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto** pelas importantes sugestões, esclarecimentos de dúvidas, disposição e amizade.

“A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da
felicidade um do outro.”

Platão

- ✓ Aos **Profs. Drs. Edson Rosa Pimentel** e **Shirlei Maria Recco-Pimentel** pelo importante apoio e incentivo no prosseguimento do curso de pós-graduação.

“Suprimir a amizade da vida é a mesma coisa que tirar o sol do mundo.”

Cícero

✓ À **Profa. Dra. Eunice Oba** e ao **Laboratório de Reprodução** da FM de Ribeirão Preto/USP pela realização das dosagens hormonais.

✓ A **todos os professores** que procuraram passar, da melhor maneira possível, seus ensinamentos.

✓ Às secretárias do Departamento de Anatomia **Maria Luíza Nogueira Rossetto Rodrigues, Dona Cleusa de Andrade Freitas e Jerusa Verpa** pela amizade, agradável convivência e colaboração destes anos.

“O prazer mais delicado é o de fazer bem aos outros. Fazei felizes e vós o sereis.”

✓ À gentilíssima secretária do Departamento de Biologia Molecular do IB da UNICAMP, **Líliam Alves Senne Panagio** pela **amizade, eterna disposição, auxílio e colaboração** durante todos estes anos.

“Todas as outras ciências são nocivas a quem não possui a ciência da bondade.”

✓ À amiga e funcionária da Biblioteca Central do *Campus* de Botucatu, **Rosemary Cristina da Silva** pela gentileza e dedicação no atendimento e revisão das referências bibliográficas.

✓ Ao Serviço de Biblioteca e Documentação da UNICAMP pela elaboração da ficha catalográfica.

✓ Aos colegas da Pós-Graduação pela **convivência agradável**.

✓ Aos grandes amigos: **Eduardo e Renata, Susi, Ricardo e Rodrigo, Vandinha, Cleuza, Dona Ivone, Seu Darwin, Marcelo, Sheldon e Michelle, André e Eliandra, Nilza** pelo **apoio carinhoso nos momentos de dificuldades**, pelos ensinamentos de vida e alegrias.

“Todas as grandezas deste mundo não valem um bom amigo.”

Voltaire

✓ Aos queridos amigos de graduação pelo **carinho, apoio e amizade** ontem, hoje e sempre.

“A amizade não conhece o esquecimento; ela tem por divisa: sempre.”

Platão

VIDA VÍVIDA

*“Quem disse que sou um covarde
Sucumbindo ante as dificuldades?
Quem disse que sou corpo feito de
alimentos?*

*A vida não é figura de cera,
Não é figura de gesso.*

*Eu sou ciclone, sou furacão, sou
Redemoinho.*

*Eu transformo o ambiente, como se
Dobrasse um arame.*

No aspecto que eu desejo.

*Eu sou Uno com a Poderosa Força
Que criou o Universo.*

*Eu sou a própria energia
Que da atmosfera*

Faz o relâmpago,

*Que transforma os raios solares em arco-íris,
Que faz eclodir do negro solo as rubras
flores,*

Que faz explodir os vulcões

*E que criou o Sistema Solar a partir da
Nebulosa.*

Que é ambiente?

Que é destino?

Na hora exata, quando eu quiser,

Eu me liberto do mais triste destino

Como o peixe que se esgueira pelas fendas.

Não sou ferro.

Não sou argila.

Sou Vida.

Sou Energia Viva.

Não sou matéria inerte

Moldado pela situação

Ou pelo destino.

Eu sou como o ar:

Quanto mais comprimido for,

Mais força manifesto, tal como a bomba

Explode a rocha.

Eu sou a Vida que, no momento certo,

Rompe impetuosamente

A situação ou o destino.

Sou também como água:

Nenhuma barreira

Poderá represar-me

Impedir que me torne um grande oceano.

Se barrarem a minha passagem

Colocando grandes pedras no meu leito,

Converter-me-ei em torrente, cachoeira,

E saltarei impetuosamente.

Se me fecharem todas as saídas, eu me

Infiltrarei no subsolo.

Permanecerei oculto por algum tempo,

Mas não tardarei a reaparecer.

Em breve estarei jorrando

Através de fontes cristalinas,

Para saciar deliciosamente

A sede dos transeuntes.

Se me impedirem também

De penetrar no subsolo

Eu me transformarei em vapor,

Formarei nuvens e cobrirei o céu

E, chegando a hora,

Atrairei furacão,

Provocarei relâmpagos e trovões,

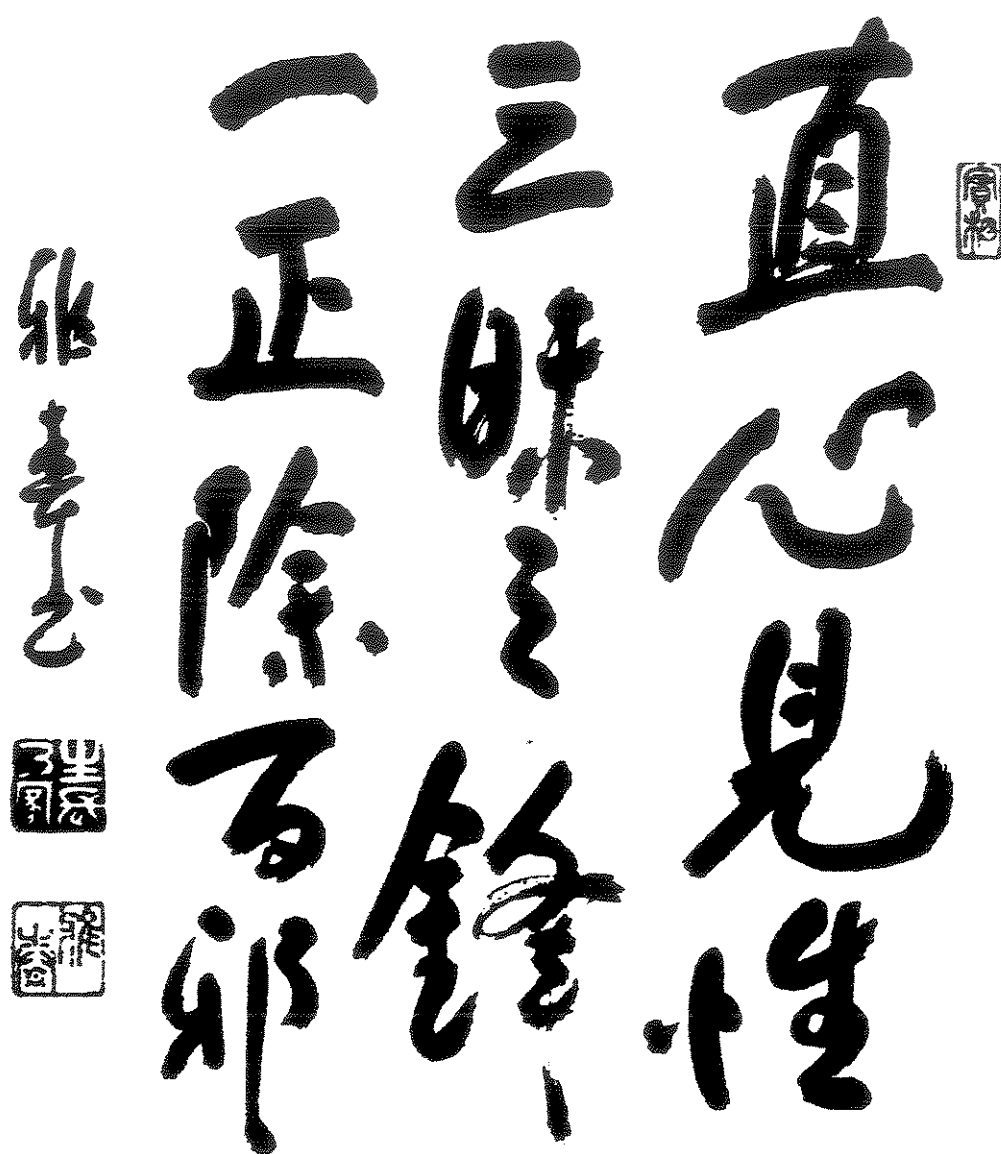
Desabarei torrencialmente,

Inundarei e romperei

Quaisquer diques e serei finalmente

Um grande oceano.”

Dr. Masaharu Taniguchi



“A mente pura e correta infalivelmente alcança a iluminação.

Um bem elimina cem males”.

Masaharu Taniguchi

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	3
Introdução Geral.....	4
Alcoolismo.....	4
Alcoolismo e câncer.....	4
Alcoolismo e ações no SNC.....	5
Alcoolismo e abuso sexual.....	5
Alcoolismo: perigos e danos.....	6
Metabolismo do etanol.....	6
Outras ações do etanol e seus metabólitos.....	8
Alcoolismo, genética e linhagem UCh.....	9
Alcoolismo e sistema genital feminino.....	10
Tuba uterina.....	11
Objetivos.....	14
Artigos.....	15
✓ Histologia e Ultra-Estrutura do Epitélio da Tuba Uterina Distal (Infundíbulo e Fímbrias) da Linhagem de Ratos UChA e UChB – Bebedora Voluntária de Etanol.....	16
✓ Ciclo Estral, Histologia e Ultra-Estrutura do Epitélio da Tuba Uterina Proximal (Intramural, Istmo e Ampola) da Linhagem de Ratos UChA e UChB – Bebedora Voluntária de Etanol.....	54
Conclusões Gerais.....	114
Referências Bibliográficas Gerais.....	115

RESUMO

O alcoolismo é o terceiro problema mais sério de Saúde Pública Mundial. A maioria é constituída de homens, entretanto, o índice de mulheres viciadas em bebidas alcoólicas vem aumentando. A tuba uterina promove o meio necessário para a maturação dos gametas femininos e masculinos (capacitação), a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião. As variedades UChA e UChB constituem modelos para os trabalhos relacionados aos aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool que são importantes fatores do alcoolismo humano. Dessa forma, o presente trabalho analisou o ciclo estral e as células epiteliais da tuba uterina da linhagem de ratos UChA e UChB, bebedores voluntários de etanol, divididos em três grupos: 1º) UChA de consumo voluntário de 6,05 g/Kg/dia de etanol a 10%; 2º) UChB de consumo voluntário de 8,18 g/Kg/dia de etanol a 10% e 3º) ratas Wistar (controle). Durante 20 dias seguidos procedeu-se à análise do ciclo estral através da coleta de esfregaços vaginais. Fêmeas em estro foram selecionadas para coleta e processamento dos órgãos, empregando-se técnicas microscópicas e morfométricas. Os grupos UChA e UChB apresentaram ciclo estral irregular. A região intramural (In) da tuba uterina dos ratos tratados apresentou vacúolos no citoplasma e cisternas dilatadas, núcleos com formatos irregulares e gotas lipídicas. A região do istmo (I) apresentou alteração de elétrons-densidade dos microvilos e distribuição irregular dos cílios, além das características citadas na região In. A região da ampola (A) apresentou aumento de corpos lamelares e gotas lipídicas no citoplasma e na luz do epitélio. Da mesma forma, as regiões de infundíbulo (Inf) e fimbrias (F) dos ratos tratados apresentaram vacúolos e lacunas com conteúdo ou não em seu interior, mitocôndrias não preservadas, corpos lamelares, gotas lipídicas e cisternas dilatadas. Foram observados núcleos com formas irregulares e núcleos e conteúdo citoplasmático na luz do epitélio. A morfologia dos cílios apresentou-se alterada. O processo degenerativo adquiriu proporções crescentes do grupo UChA para o UChB. Os grupos tratados apresentaram menores áreas citoplasmáticas e nucleares comparados ao controle. Conclui-se que o etanol altera o ciclo estral e a estrutura das células epiteliais da tuba uterina. Devido às alterações, os processos de capacitação e fertilização estão comprometidos. Infere-se que devido à grande

quantidade de lisosomos e formação de vacúolos, o álcool induza inicialmente morte celular diferente da apoptose.

Palavras-chave: ciclo estral; histologia; ultra-estrutura; tuba uterina; ratas UCh; etanol.

ABSTRACT

Alcoholism is the third most serious problem of World Public Health. Although the majority consists of men, the index of women addicted to alcoholic beverages is increasing. The uterine tube promotes the necessary means for maturation of female and male gametes (capacitation), the fertilization and the initial development of the embryo. The varieties UChA and UChB constitute rare models for works related to genetic, biochemical, physiological, nutritional, and pharmacological effects of alcohol that are important factors in human alcoholism. Thus the present work analyzed the estrous cycle and the epithelial cells of the uterine tube (*intramural* – In, *isthmus* – I, *ampulla* – A, *infundibulum* – Inf and *fimbrias* – F) of the rat lineage UChA and UChB, voluntary drinkers of alcohol, divided into three groups: 1st) UChA, voluntary consumption of 6.05 g/Kg/day of ethanol 10%; 2nd) UChB, voluntary consumption of 8.18 g/Kg/day of ethanol 10% and 3rd) Wistar rats (control). For 20 following days it was preceded to the analysis of the estrous cycle through the collection of vaginal smears. Females in estrus were selected for collection and processing of organs, employing microscopic and morphometric techniques. The UChA and UChB rats show irregular estrous cycle. The In region of treated rats presented cytoplasmic vacuoles and dilated cisterna, nuclei with irregular forms and lipid droplets. The I region showed altered electron-density and irregular distribution of the cilia, and the characteristics mentioned in the In region. The A region showed increase of lamellar bodies and lipid droplets in the cytoplasm and lumen of the epithelium. The Inf and F of treated rats showed vacuoles and lacunas with content or not in their interiors, non-preserved mitochondria, lamellar bodies, lipid droplets and dilated cisterna. There were observed nuclei with irregular forms and nuclei and cytoplasmic content in the lumen of the epithelium. Morphology of the cilia was observed to be altered. The degenerative process acquired growing proportions from the UChA group to the UChB one. Treated groups presented smaller cytoplasmic and nuclear areas compared to the control. It's concluded that ethanol alters the estrous cycle and the epithelial cell structure of uterine tube. Due the alterations, the fertilization and the capacitation process of ethanol-drinking rats are damaged. Yet it is inferred that due to the great quantity of lysosomes and formation of vacuoles, alcohol initially leads to cell death different from the apoptosis.

Keywords: estrous cycle; histology; ultrastructure; uterine tube; UCh rats; ethanol.

INTRODUÇÃO GERAL

Alcoolismo

O alcoolismo é o 3º problema mais sério de Saúde Pública Mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define alcoolismo como o consumo de bebidas alcoólicas de forma continuada causando prejuízo emocional, social e físico ao indivíduo. O alcoolismo social é uma forma de dependência crônica aceita e praticada pela maioria dos adultos nas sociedades modernas e, o alcoolismo agudo e crônico se constitui na principal forma de toxicomania da espécie humana na atualidade. O alcoolismo, os transtornos bipolares, a esquizofrenia e a depressão representam as principais doenças classificadas no grupo de distúrbios mentais. As mulheres são as mais atingidas, mas não existe uma explicação científica definitiva para o fato. Segundo a OMS, em 1996, 120 milhões de pessoas sofriam de alcoolismo no mundo e 103 mil morreram por motivos relacionados à doença (Secretaria Executiva de Saúde Pública – SESPA, 2005).

Alcoolismo e câncer

Dados epidemiológicos têm identificado o consumo crônico de álcool como um fator de risco para o aumento do câncer do trato alimentar, incluindo câncer da orofaringe, laringe, esôfago e do fígado. O risco aumentado atribuído ao consumo de álcool do câncer no intestino grosso e do câncer de mama é muito menor. No entanto, embora o risco seja menor, a carcinogênese pode estar aumentada com baixas doses de etanol. Embora os mecanismos exatos pela qual a ingestão crônica de álcool estimula a carcinogênese sejam desconhecidos, estudos experimentais em animais suportam o conceito de que o etanol não é carcinogênico, mas, sob certas condições experimentais, é um promotor de tumor (Poschl & Seitz, 2004). Segundo Seitz *et al.* (1985), a ingestão crônica de álcool aumentou significativamente o número total de tumores retais enquanto que na mulher o risco de câncer foi maior nas vias biliares e moderadamente aumentado na cérvix uterina (Prior, 1988).

Alcoolismo e ações no Sistema Nervoso Central

O álcool pode induzir amplos efeitos no Sistema Nervoso Central em níveis neurofisiológicos, morfológicos e neuropsicológicos (Moselhy *et al.*, 2001). Estudos em animais têm demonstrado que o álcool altera as concentrações de neurotransmissores no cérebro (De Witte, 1996). Essas mudanças em níveis de dopamina, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), peptídios opióides endógenos e noradrenalina estão associadas com a ativação dos centros de “recompensa” do cérebro. Acredita-se que essa propriedade do etanol é responsável pelo reforçamento do hábito do consumo de álcool em ratos (De Witte, 1996). Segundo Guerri (1987), a exposição pré-natal ao álcool atrasa o desenvolvimento sináptico do feto, ao passo que a exposição continuada durante a lactação pode alterar a estrutura físico-química das membranas sinápticas. O consumo de doses intoxicantes de álcool aumenta a probabilidade de comportamento violento (Pihl & LeMarquand, 1998). Existe considerável evidência associando comportamento agressivo, deficiência de serotonina e consumo de álcool (Badawy, 1998). É sabido que o consumo de álcool exerce efeitos importantes no metabolismo da serotonina. Assim, indivíduos susceptíveis à agressividade após consumo alcoólico exibem uma acentuada depleção de serotonina cerebral, o que os torna propensos à agressão em resposta não só ao meio, como a estímulos psicológicos (Badawy, 1998). Segundo Bergman & Brismar (1994), 57% dos alcoólicos descrevem uma história de comportamento violento, sendo que ainda existe uma correlação positiva entre violência no lar, comportamento criminoso e abuso de drogas. A dependência de drogas psicotrópicas legais (PTD) está aumentada em alcoólicos. Dados obtidos de pacientes internadas por alcoolismo apontaram para o uso freqüente de substâncias psicoativas entre as mulheres, principalmente analgésicos e tranqüilizantes (Kubicha *et al.*, 1993). O alcoolismo também está associado com o abuso de drogas ilegais (Thomsen & Frohlich, 1995; Johansson *et al.*, 2003).

Alcoolismo e abuso sexual

Estudos têm sido realizados sugerindo associação entre problemas com álcool e abuso sexual. Os mecanismos envolvem: abuso sexual à mulher como causa do abuso de álcool pelo homem, abuso de álcool pela mulher predispondo a um “ataque” sexual pelo

homem ou as duas condições associadas (Moncrieff & Farmer, 1998). Outro fator importante refere-se à gravidez não-planejada, resultante do consumo abusivo de álcool, devido à perda da motivação para utilizar alguma forma de contraceptivo (Lobb, 1984).

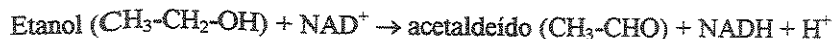
Alcoolismo: perigos e danos

Os acidentes com veículos automotores, em grande parte, estão relacionados com o consumo abusivo de álcool (Mayou & Bryant, 1995; Thomsen & Frohlich, 1995; Cunningham *et al.*, 2002) e, a dependência ao álcool é um fator de risco para o suicídio, sendo que na população geral o consumo de álcool e as taxas de suicídio estão associados (Pirkola *et al.*, 2000; Waern, 2003). Porém, constatou-se maior risco relativo a acidentes fatais entre mulheres que consumiam acima de três doses diárias de bebidas alcoólicas (Ross *et al.*, 1990) e incidência de suicídio mais alta entre mulheres do que entre homens (Hochgraf *et al.*, 1995).

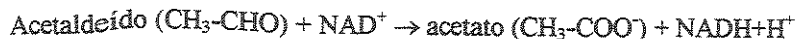
Metabolismo do etanol

O metabolismo do etanol ocorre principalmente no fígado e envolve duas rotas. A primeira, e principal, utiliza a enzima álcool-desidrogenase (ADH) e a enzima aldeído-desidrogenase (ALDH), convertendo o etanol via acetaldeído em acetato, que é então convertido em acetil-CoA.

ADH



ALDH



NADH reduzido + H^+ são produzidos nessas duas reações. A razão NADH/NAD^+ pode, portanto, aumentar apreciavelmente após a ingestão de grandes quantidades de etanol (Murray, 1998). Os níveis elevados de NADH favorecem a formação de lactato a partir do piruvato, respondendo pela acidose láctica que diminui a capacidade do rim de excretar o ácido úrico. O último efeito é, provavelmente, a causa de agravamento da gota pela ingestão de álcool (Mayes, 1998). Também é reduzida a concentração de piruvato

(necessário à reação da piruvato carboxilase), inibindo, portanto, a gliconeogênese (Murray, 1998). Dessa forma, o fígado simplesmente é incapaz de lidar com os equivalentes de redução formados pela oxidação do etanol, em velocidade suficientemente grande para impedir desvios metabólicos (Krebs *et al.*, 1969; Service, 1995). O NADH gerado compete com os equivalentes redutores de outros substratos da cadeia respiratória, inibindo suas oxidações. O aumento da relação NADH/NAD^+ origina um deslocamento para a esquerda do equilíbrio malato $\leftrightarrow$ oxaloacetato, que pode reduzir a atividade do ciclo do ácido cítrico. O resultado efetivo da inibição da oxidação do ácido graxo conduz a um aumento da síntese hepática de triacilgliceróis, o que aparentemente é a causa do fígado gorduroso (Mayes, 1998).

A segunda rota envolve o citocromo P450 microsomal (o sistema microsomal oxidante do etanol) que aumenta de atividade no **alcoolismo crônico**, podendo responder pelo aumento da degradação metabólica e, também, pela produção de acetaldeído (Murray, 1998). Segundo Odeleye *et al.* (1991), os efeitos do consumo prolongado de etanol aumentam o colesterol hepático, fosfolípidos e triacilgliceróis no fígado de fêmeas de camundongo C57BL/6. Os resultados, indicativos de mudanças no metabolismo de lipídio, sugerem que a ingestão continuada de baixos níveis de etanol produz respostas bioquímicas e hepatotóxicas.

O acetaldeído é uma molécula altamente reativa que pode formar ligações com proteínas, ácidos nucleicos (DNA) e outras moléculas. Parece provável que sua capacidade de reagir com várias moléculas esteja envolvida com a causa dos efeitos tóxicos do etanol como ações teratogênicas e mutagênicas (Poschl & Seitz, 2004). A modulação de geração e de degradação do acetaldeído ocorre devido a polimorfismos funcionais dos genes que codificam as enzimas. Indivíduos com alelo atípico da aldeído-desidrogenase ALDH2 são sensíveis ao etanol e têm risco reduzido de desenvolver doenças relacionadas ao alcoolismo. A expressão de uma forma inativa de isoenzima ALDH2 resulta no prejuízo da capacidade de metabolização do acetaldeído (Ehrig *et al.*, 1990). Anormalidades genéticas do *locus* da ALDH1 estão também associadas com o enrubescimento provocado pelo etanol. O gene ADH6 tem elementos de resposta hormonal e pode explicar as diferenças de gênero (masculino e feminino) associadas aos problemas com álcool (Yoshida, 1994).

Diferenças entre indivíduos no padrão da isoenzima podem contribuir para determinar geneticamente a predisposição ao consumo excessivo de álcool (Ehrig *et al.*, 1992). A álcool-desidrogenase é também encontrada na mucosa gástrica, apresentando uma atividade 60% menor na mulher do que no homem. O aumento da disponibilidade do etanol, que resulta de uma diminuição de sua utilização gástrica, pode ser responsável pelo aumento da susceptibilidade da mulher aos efeitos do consumo de álcool (Mayes, 1998). O mesmo autor aponta que outros efeitos do etanol podem incluir o aumento da lipogênese e da síntese de colesterol a partir de acetil-CoA.

Outras ações do etanol e seus metabólitos

O etanol induz apoptose (Liu *et al.*, 2000; Jankala *et al.*, 2002) e parece também ser capaz de se interpor em membranas biológicas, expandindo-as e aumentando sua fluidez (Murray, 1998). Quando as membranas afetadas são excitáveis, isto resulta em alterações em seus potenciais de ação, prejudica o transporte ativo através das mesmas e também afeta a liberação de neurotransmissores. Tudo isto deprime a função cerebral e, se suficientemente severo, pode produzir coma e morte por paralisia respiratória (Lieber, 1995; Murray, 1998). O etanol potencializa a ação de outras drogas (sinergismo). Os barbituratos e o álcool interagem com o canal de cloreto ativado por γ -aminobutirato (GABA). A ativação do canal de cloreto inibe o disparo neuronal, o que pode explicar os efeitos depressores de ambos os compostos (Misra *et al.*, 1971). Baixas doses de etanol causam uma queda no desempenho motor e intelectual; altas doses têm efeito depressor que pode levar a estupor e anestesia (Krebs *et al.*, 1969; Service, 1995). Alcoólicos crônicos correm considerável risco de deficiências nutricionais. Os problemas mais comuns são sintomas neurológicos associados a deficiências de tiamina ou piridoxina e problemas hematológicos associados a deficiências de folato ou piridoxina (Hayumpa, 1986; Lieber, 1991). O etanol causa alterações patológicas do trato gastrointestinal que, com frequência, interferem diretamente com a absorção de certos nutrientes. A severa lesão hepática associada ao alcoolismo crônico parece interferir diretamente com o armazenamento e a ativação de certos nutrientes. Alguns alcoólicos também desenvolvem uma neuropatia periférica que responde a suplementação por piridoxina. Em particular, o acetaldeído

desloca o piridoxal fosfato da proteína transportadora no plasma. O piridoxal fosfato livre é, então, rapidamente degradado a compostos inativos e é excretado (Hayumpa, 1986; Lieber, 1991). Aparentemente, o etanol provoca, pelo sistema P450 hepático, catabolismo aumentado da vitamina A. Além do mais, alcoólicos geralmente apresentam níveis séricos baixos de zinco, cálcio e magnésio, devido à ingestão dietética deficiente e perda urinária aumentada (Hayumpa, 1986; Lieber, 1991).

Alcoolismo, genética e linhagem UCh

O alcoolismo é uma doença genética complexa resultante de sua característica poligênica (Schumann *et al.*, 2003). Um dos grandes objetivos da pesquisa genética do alcoolismo é a identificação de genes protetores e de risco específicos, a fim de determinar seu papel funcional na etiologia da doença. Vários estudos têm demonstrado que fatores genéticos, sociais e ambientais contribuem para o risco de dependência ao alcoolismo. Além disso, a capacidade aumentada do homem para metabolizar o álcool resulta em uma menor concentração de álcool no sangue, servindo como explicação para as diferenças do gênero (feminino e masculino) de consumo de álcool em humanos, assim como padrões específicos, relacionados ao sexo, da preferência ao álcool em ratos (Almeida *et al.*, 1998). O uso de linhagens animais geneticamente específicas têm provado historicamente ser uma ferramenta poderosa para examinar a influência genética da dependência alcoólica (Crabbe, 1987). Através do desenvolvimento de modelos animais de preferência ao álcool, estão sendo identificados *loci* cromossômicos e genes candidatos que influenciam o comportamento da ingestão de álcool. Os ratos da variedade UChA e UChB são importantes para o estudo de características únicas ao alcoolismo humano. Denominou-se UChA e UChB as linhagens de baixo e alto consumo de etanol, respectivamente (UCh = Universidade do Chile), que diferem quanto à atividade cerebral da aldeído-desidrogenase e na capacidade de desenvolver tolerância aguda ao etanol (Tampier *et al.*, 1984;1994). Mardones *et al.* (1953) iniciaram os experimentos de cruzamentos consanguíneos entre ratos de consumo baixo e alto de álcool. As variedades constituem modelos raros para os trabalhos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e

farmacológicos dos efeitos do álcool, tão bem quanto a apetite e a tolerância que são fatores importantes do alcoolismo humano.

Alcoolismo e sistema genital feminino

Diversos trabalhos têm abordado uma eventual exacerbação do consumo alcoólico em determinadas fases do ciclo menstrual, particularmente na fase lútea tardia, ou pré-menstrual, atribuindo ao álcool uma ação ansiolítica durante essa fase, o que tornaria seu consumo uma “automedicação” (Tate e Charette, 1991; McLeod *et al.*, 1994). A influência do consumo de álcool sobre o funcionamento hormonal feminino encontra referências na literatura (Mello *et al.*, 1989; Pettersson *et al.*, 1990; Eriksson *et al.*, 1996). Estudos em animais (Mello *et al.*, 1992) revelaram que o consumo de álcool levaria a uma resposta pituitária deficiente com uma menor liberação de hormônio luteinizante (LH) após o estímulo de E2 (β -estradiol). Esse fato poderia estar associado a uma maior frequência de ciclos anovulatórios em alcoólicas crônicas. O consumo abusivo ou a dependência alcoólica parecem estar associados a diversas alterações do ciclo reprodutivo, desde a ocorrência de amenorréia ou irregularidades menstruais (Becker *et al.*, 1989), disfunções ovarianas com ciclos anovulatórios, menopausa prematura, além de relatos de maior risco para infertilidade (Wilsnack *et al.*, 1984), aborto espontâneo (Kesmodel *et al.*, 2002), intervenções cirúrgicas ginecológicas, além de prejuízos ao desenvolvimento fetal (Hamid *et al.*, 1987; Roman, 1988; Mello *et al.*, 1989; Becker *et al.*, 1989; Teoh *et al.*, 1992; Carrara *et al.*, 1993; Wolfe *et al.*, 2000; Stromland & Pinazo-Duran, 2002). Valimaki *et al.* (1995) confirmaram níveis significativamente maiores de testosterona (65%) durante a fase lútea de mulheres alcoólicas, quando comparadas com controles, refletindo um desequilíbrio hormonal. Outro aspecto importante do consumo crônico de álcool pelas mulheres é a sua relação com a osteoporose. Considera-se que a osteoporose resulta do desequilíbrio de um sistema complexo, mantido por vários fatores nutricionais, hormonais e metabólicos (Halbreich & Palter, 1996). Além disso, a exposição ao álcool pode induzir erros na segregação cromossômica do ócito ovulado. O sucesso na fertilização de tais gametas resulta, conseqüentemente, na produção de embriões aneuplóides que apresentam grande chance de serem abortados espontaneamente durante o primeiro trimestre de

gravidez (Kaufman, 1997). Da mesma forma, o consumo crônico de etanol por fêmeas jovens de camundongos resulta em diminuição da fertilização, retardo no crescimento do embrião e perda do embrião devido a alterações induzidas no gameta feminino (Cebral *et al.*, 2000). O abuso de álcool maternal durante a gravidez causa a Síndrome Alcoólica Fetal (FAS), caracterizada por retardamento do crescimento pré e pós-natal, anomalias do sistema nervoso central e malformações crânio-faciais (Wolfe *et al.*, 2000; Stromland & Pinazo-Duran, 2002).

Tuba uterina

A tuba uterina é um órgão longo e enovelado, cujo grau de enovelamento varia entre as espécies. As tubas uterinas dos mamíferos são condutos tubulares derivados embriologicamente da região cranial do ducto Mülleriano. É estrutura vital e altamente especializada no processo reprodutivo das fêmeas e assume papéis importantes na reprodução animal. Portanto, as tubas uterinas são mais do que um simples conduto para o transporte do oócito, dos espermatozóides, do zigoto ou do embrião, do ovário para o útero. A tuba uterina é um órgão ativo que possibilita o encontro dos gametas, mantém e modula o meio fluido dinâmico (Hafez, 1995; Abe, 1996a; Lapointe & Bilodeau, 2003; Killian, 2004). As secreções do epitélio da tuba uterina formam o fluido (Leese 1988, 2001) que promove o meio necessário para a maturação dos gametas femininos e masculinos (capacitação), a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião (Bareither & Verhage, 1981; Odor *et al.*, 1983; Abe, 1996a; Bui & Alvarez, 2003; Bhatt *et al.*, 2004; Killian, 2004). A tuba uterina pode ser dividida em quatro regiões distintas e seqüentes, baseadas na estrutura das camadas muscular e mucosa: intramural (junção útero-tubal), istmo, ampola e infundíbulo (Nilsson & Reinius, 1969). O infundíbulo apresenta na extremidade livre prolongamentos, as fimbrias, caracterizadas por pregas da mucosa. O epitélio da tuba uterina é do tipo colunar simples, formado de células ciliadas e células não-ciliadas (secretoras). Alguns autores consideram ainda um terceiro tipo celular, a célula basal (Nellor, 1965; Odor, 1982; Hollis *et al.*, 1984). Os cílios das células ciliadas são responsáveis pelo transporte dos oócitos no interior da tuba uterina (Odor & Blandau, 1973). As células secretoras produzem e secretam para a luz da tuba uterina proteínas,

glicoproteínas (Oliphant, 1986), enzimas e fatores de crescimento (Morishita *et al.*, 1992; Carlsson *et al.*, 1993), sugerindo-se que a interação entre as células epiteliais da tuba uterina e os gametas masculinos é necessária para o término da maturação dos espermatozoides (Ellington *et al.*, 1993a,b). No rato, foram descritos numerosos e grandes grânulos de secreção nas células secretoras da região do istmo e, ocasionalmente, grânulos de secreção pequenos nas células secretoras das regiões da ampola e das fimbrias (Abe, 1994). As células basais já foram descritas como células de origem não-epitelial: linfócitos (Hollis *et al.*, 1984; Eriksen *et al.*, 1994; Crow *et al.*, 1994) e macrófagos (Brenner & Slayden, 1994). A ultra-estrutura desse tipo celular já foi descrita em carneiros (Hollis *et al.*, 1984), coelhos (Odor, 1974), vacas e porcas (Nellor, 1965), e primatas (Odor, 1982), embora a função ainda seja incerta. Alguns autores inferiram sobre o seu papel na ciliogênese e na repopulação celular (Bullón *et al.*, 1980). Estudos têm demonstrado diferenças regionais relacionadas com as alterações cíclicas nas células epiteliais (Abe, 1996b). Variações regionais marcantes nas características morfológicas, histoquímicas e bioquímicas das células secretoras têm sido demonstradas em muitas espécies, embora ainda não esteja totalmente esclarecido o seu significado biológico (Abe, 1996b; Almeida, 2000).

O foco da literatura experimental em estudos relacionados ao alcoolismo tem-se voltado principalmente para o homem, enquanto estudos em mulheres não têm sido conclusivos (Hoaken & Pihl, 2000). Além disso, a identificação do alcoolismo feminino em atendimentos de saúde parece ser deficiente e pouco valorizada (Chang *et al.*, 1997). Devido ao aumento da dependência ao álcool na mulher e à evidência de que as consequências do consumo crônico de álcool são mais severas nas mulheres (Norton *et al.*, 1987; Harper *et al.*, 1990; Glenn, 1993), faz-se necessário investigar todos os mecanismos biológicos possíveis que possam levar à prevalência relacionada com o gênero. De igual maneira, vários cromossomos e genes candidatos têm sido avaliados em seu possível papel no alcoolismo. No entanto, com exceção dos genes que codificam as enzimas do metabolismo do álcool, os resultados têm sido contraditórios (Foroud & Ting-Kai, 1999). Como estratégia alternativa, os pesquisadores têm utilizado modelos de ratos para

identificar quantitativamente a influência de *loci* cromossomais característicos de preferência ao alcoolismo.

Apesar do grande número de trabalhos dos efeitos do álcool sobre os sistemas endócrino e nervoso, fígado, pâncreas, rins, intestino e sistema genital masculino, a literatura mostra-se deficiente quanto às consequências do álcool no sistema genital feminino (Van Thiel *et al.*, 1977; Bo *et al.*, 1982; Les Dees and Skelley, 1990, Martinez *et al.*, 1999 e Laura *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos analisar o ciclo estral e a estrutura das células epiteliais da tuba uterina da linhagem de ratos UChA e UChB, bebedora voluntária de etanol.

ARTIGOS

- ✓ **Histologia e Ultra-Estrutura do Epitélio da Tuba Uterina Distal (Infundíbulo e Fímbrias) da Linhagem de Ratos UChA e UChB – Bebedora Voluntária de Etanol, submetido ao *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*.**
- ✓ **Ciclo Estral, Histologia e Ultra-Estrutura do Epitélio da Tuba Uterina Proximal (Intramural, Istmo e Ampola) da Linhagem de Ratos UChA e UChB – Bebedora Voluntária de Etanol.**

Histologia e Ultra-estrutura do Epitélio da Tuba Uterina Distal (Infundíbulo e Fimbrias) da Linhagem de Ratos UChA e UChB – Bebedora Voluntária de Etanol

Almeida-Francia CCD, Farje LADF, Padovani CR, Pinheiro PFF, Martinez M, Segatelli TM, Martinez FE

Resumo

Objetivo: O alcoolismo é o terceiro problema mais sério de Saúde Pública Mundial. A maioria é constituída de homens, entretanto, o índice de mulheres viciadas em bebidas alcoólicas vem aumentando. A tuba uterina promove o meio necessário para a maturação dos gametas femininos e masculinos (capacitação), a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião. As variedades UChA e UChB constituem modelos raros para os trabalhos relacionados aos aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool que são importantes fatores do alcoolismo humano. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar as células epiteliais da tuba uterina distal (infundíbulo – Inf e fimbrias – F) da linhagem de ratos UChA e UChB, bebedores voluntários de etanol.

Métodos: Os animais foram divididos em três grupos: 1º) UChA de consumo voluntário médio de 6,05 g/Kg/dia de etanol a 10%; 2º) UChB de consumo voluntário médio de 8,18 g/Kg/dia de etanol a 10% e 3º) ratas Wistar (controle). Fêmeas em estro foram selecionadas para coleta e processamento dos órgãos, empregando-se técnicas microscópicas e morfométricas.

Resultados: As células epiteliais (secretoras e ciliadas) das regiões de Inf e F dos ratos tratados apresentaram vacúolos e lacunas com conteúdo ou não em seu interior, mitocôndrias não preservadas, corpos lamelares, gotas lipídicas e cisternas dilatadas. Também foram observados núcleos com formas irregulares ou núcleos e conteúdo citoplasmático na luz do epitélio. A morfologia dos cílios apresentou-se alterada. O processo degenerativo adquiriu proporções crescentes do grupo UChA para o UChB. Os

grupos tratados apresentaram menores áreas citoplasmáticas e nucleares comparadas ao controle.

Conclusão: Devido às alterações morfológicas e, conseqüentemente, funcionais o processo reprodutivo dos ratos bebedores de etanol está comprometido. Infere-se, ainda, que devido à grande quantidade de lisossomos e formação de vacúolos, o álcool induza inicialmente morte celular diferente da apoptose.

Introdução

O alcoolismo é o terceiro problema mais sério de Saúde Pública Mundial. Pesquisas da Organização Mundial de Saúde demonstraram que, em 1996, 120 milhões de pessoas sofriam de alcoolismo no mundo e 103 mil morreram por motivos relacionados à doença. A grande maioria é constituída de homens, entretanto, o índice de mulheres viciadas em bebidas alcoólicas vem aumentando (Hochgraf et al., 1995; Martinez et al., 1999). A conquista da mulher no mercado de trabalho trouxe autonomia, mas, conjuntamente vieram os vícios toxicológicos de dependência química, dos quais o álcool é o mais acessível por ser regulamentado. Apesar do grande número de trabalhos dos efeitos do álcool sobre os sistemas endócrino e nervoso, fígado, pâncreas, rins, intestino e sistema genital masculino, a literatura mostra-se deficiente quanto às conseqüências do álcool no sistema genital feminino (Van Thiel et al., 1977; Bo et al., 1982; Les Dees and Skelley, 1990; Martinez et al., 1999; Laura et al., 2003).

A tuba uterina é um órgão longo e enovelado, cujo grau de enovelamento varia entre as espécies. As secreções do epitélio da tuba uterina formam o fluido (Leese, 1988; Leese *et al.*, 2001) que promove o meio necessário para a maturação dos gametas femininos e masculinos (capacitação), a fertilização e, através de sua composição química, o desenvolvimento inicial do embrião (Bareither and Verhage, 1981; Odor et al., 1983; Abe, 1996a; Buhi and Alvarez, 2003; Killian, 2004; Bhatt et al., 2004). Os eventos biológicos que ocorrem ao longo da tuba uterina são distintos, variando entre as regiões. Variações

regionais marcantes nas características morfológicas, histoquímicas e bioquímicas das células secretoras têm sido demonstradas em muitas espécies (Abe, 1996b). No entanto, ainda não está totalmente esclarecido o seu significado biológico (Abe, 1996b; Palter et al., 2001; Barriere et al., 2002).

Os modelos animais permitem a condução de experimentos que não podem ser realizados com seres humanos por motivos éticos. Outro fator importante é o controle experimental impossível de ser alcançado com humanos. Entre as vantagens de se utilizar roedores, destacam-se a rápida reprodução, o pouco espaço físico ocupado e o baixo custo de manutenção (Runza, 2004). Mardones et al. (1953) iniciaram os experimentos de cruzamentos consanguíneos entre ratos de consumo baixo e alto de álcool. Denominou-se UChA e UChB às linhagens de baixo e alto consumo de etanol, respectivamente (UCh = Universidade do Chile) que diferem quanto à atividade cerebral da enzima aldeído-desidrogenase e na capacidade de desenvolver tolerância aguda ao etanol. As variedades constituem modelos raros para os trabalhos relacionados aos aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool, tão bem quanto a apetite e a tolerância que são importantes fatores do alcoolismo humano.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar a estrutura das células epiteliais da tuba uterina distal (Infundíbulo e Fimbrias) da linhagem de ratos UChA e UChB, bebedores voluntários de etanol.

Material e Métodos

Foram utilizadas 42 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), adultas (4 meses), com peso médio de 280g, cujas matrizes foram importadas do biotério do Departamento de Farmacologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile. Os animais constituíram 3 grupos: 1º) ratas UChA de consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol) e

consumo médio de etanol de 6,046g/Kg/dia, 2º) ratas UChB de consumo voluntário de etanol a 10% e consumo médio de etanol de 8,177g/Kg/dia e 3º) ratas Wistar de consumo voluntário de água utilizadas como controle, cedidas pelo Biotério Central do *Campus* de Botucatu/UNESP. As fêmeas tratadas receberam etanol durante 55 a 65 dias. Todos os animais receberam dieta sólida constituída de ração Nuvital e o protocolo experimental seguiu os princípios éticos de pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Microscopia de Luz (MLuz): Historesina

Foram sacrificadas no estro, após saturação anestésica com éter etílico, 21 fêmeas (7 de cada grupo). As tubas uterinas, sem separar dos ovários direitos, foram dissecadas sob microscópio cirúrgico D. F. Vasconcelos e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 6h. Os órgãos foram acondicionados em álcool 70% na geladeira, por 48h. A desidratação foi realizada em álcool 95% durante 4h e a infiltração em resina plástica “Historesin” (Reichert – Jung/Embedding Kit – Alemanha) mais álcool durante 4h. Os órgãos foram imersos em resina pura por 12h. As amostras de tecido foram incluídas e transportadas para histomoldes etiquetados (histomold - LKB – Alemanha), contendo mescla de inclusão (líquido de infiltração + endurecedor). Os histomoldes foram colocados em estufa a 60°C durante 3h. Os blocos do material incluído foram cortados com 5µm de espessura em micrótomo LEICA 2145. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina (AT) e ácido periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

MLuz: Fosfatase Ácida (FA)

As tubas uterinas, sem separar dos ovários e extremidades craniais dos cornos uterinos esquerdos, foram coletadas e dissecadas. O material foi coberto com talco para a preservação do tecido e congelado em nitrogênio líquido. Os órgãos reprodutores congelados foram transferidos para câmara de criostato LEICA CM1800 Cryostat (Alemanha) a -20°C e mantidos durante 15 a 20min. Os órgãos foram colados pela extremidade cranial do corno uterino em suporte metálico, utilizando-se adesivo especial: "Tissue-Tek" (OCT – Optimal Critical Temperature). Os ovários e tubas uterinas foram seccionados com $5\mu\text{m}$ de espessura. Os cortes foram submetidos às soluções de pararosanilina hidrociorada e nitrito de sódio a 4% e misturados com 5mg de naphthol AS – B1 (dissolvido em 0,5ml de n-n-dimetilformamida), 2,5ml de tampão veronal acetato e 6,5ml de água destilada. O pH foi ajustado para 5,0 e os cortes foram incubados a 37°C por 60min, lavados em água destilada e contrastados com metil verde. Finalmente, os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em álcool absoluto e montados no meio sintético (Burnstone, 1958; modificado por Barka, 1960). As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

21 animais (7 de cada grupo) foram sacrificados em estro após saturação anestésica com éter etílico. As tubas uterinas e os ovários direitos foram fragmentados e imersos em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 6h. Em seguida, foram pós-fixados em Tetróxido de Ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 2h no escuro. Um terceiro fixador, acetato de Uranila 0,5% em água com sacarose 13,3% foi usado por 2h. Posteriormente, foi realizada desidratação do material em série crescente de acetona (50 até 100%). Os fragmentos foram incluídos em resina (Araldite® 506). Os blocos foram trimados e os cortes de $0,5\mu\text{m}$ de espessura (semi-finos) obtidos no ultramicrotomo LBK BROMA 8800 ULTRATOME com navalha de vidro. Os cortes foram corados com azul de metileno e azur II (1:1), analisados em microscópio de luz e selecionadas áreas específicas

para MET. Os blocos foram retrimados, seccionados com 60 a 80nm de espessura no ultramicrotomo LBK BROMA 8800 ULTRATOME. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), analisados e fotografados no MET PHILLIPS EM 301 do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP e LEO 900 ZEISS do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da FMB/UNESP.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As tubas uterinas, sem separar dos ovários esquerdos dos animais utilizados para MET, foram coletadas. Foram fragmentados em aproximadamente 1,0 mm de largura, imersos em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 2h. Os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de soluções de álcool (70% a 100%), levados para secar em PONTO CRÍTICO BALZERS UNION, montados em base metálica e levados ao metalizador MED 010 BALZERS UNION, onde foram recobertos com ouro. As amostras foram analisadas e fotografadas no MEV SEM-515 do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP.

Morfometria da Tuba Uterina

As tubas uterinas de 6 animais dos 3 grupos de estudo, utilizadas na preparação de lâminas histológicas para microscopia de luz e coradas com HE, foram utilizadas nas análises morfométricas. Foram mensuradas as áreas nucleares, citoplasmáticas, totais (citoplasma + núcleo) e altura das células epiteliais da tuba uterina. Utilizou-se para mensuração das variáveis descritas o Sistema de Análise de Imagens Computadorizado KS-300 (Zeiss) do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP. A estatística das variáveis descritas foi realizada através da técnica da análise de variância multivariada dos perfis médios dos grupos (Johnson e Wichern, 1998) em experimentos inteiramente casualizados. A técnica

de análise foi complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey para contraste entre médias dos grupos. Os resultados foram apresentados em tabelas e, todas as conclusões estatísticas foram realizadas em nível de 5% de significância. Detalhes a respeito da metodologia empregada podem ser encontrados em Banzatto & Kronka (1989).

Resultados

Microscopia de Luz (MLuz)

O epitélio da tuba uterina do rato é formado por dois tipos de células: secretora (CS) e ciliada (CC).

A região do infundíbulo (Inf) dos ratos do grupo controle apresentou-se pregueada com dobras longitudinais longas e ramificadas em direção à luz (Fig. 1A,D). Observou-se altura homogênea do epitélio a partir da lâmina própria (Fig. 1A) e colorações HE (Fig. 1A) e AT (Fig. 1D) homogêneas. Os núcleos das CC e CS apresentaram-se com nucléolos evidentes. Em HE, o conjunto dos corpúsculos basais das CC formou nítida linha na superfície apical. A reação ao PAS apresentou-se como pontos de marcações esporádicos pelo citoplasma das células (Fig. 1G). A reação à FA foi intensa na porção supra-nuclear, mas não atingindo as extremidades apicais das células (Fig. 1J).

A região do Inf dos ratos UChA apresentou menor quantidade de dobras em direção à luz comparada ao controle (Fig. 1E). As respostas aos corantes HE (Fig. 1B) e AT (Fig. 1E) apresentaram-se heterogêneas. O epitélio apresentou lacunas em grandes quantidades com conteúdo ou não em seu interior e vacúolos distribuídos pelo citoplasma das células (Fig. 1B). Alguns núcleos apresentaram-se com nucléolos evidentes e outros mais condensados. Em AT, foram observadas células epiteliais que pareciam extravasar conteúdo para a luz (Fig. 1E). A reação ao PAS apresentou-se acentuada e pontual no citoplasma das CC,

principalmente na porção infra-nuclear (Fig. 1H). A reação à FA foi similar ao grupo controle para a mesma região (Fig. 1K).

A região do Inf dos ratos UChB apresentou dobras mais escassas em direção à luz comparadas aos grupos UChA e controle (Fig. 1F). Em AT, o epitélio apresentou aspecto diafanizado (com aparente atrofia das células) (Fig. 1F). Presença de vacúolos e, em maior número, lacunas grandes com conteúdo ou não em seu interior (Fig. 1C). Os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao grupo UChA e as colorações em HE (Fig. 1C) e AT heterogêneas (Fig. 1F). A reação ao PAS foi pontual, principalmente na porção supra-nuclear, e mais fraca comparada ao UChA (Fig. 1I). O tecido apresentou aspecto de retração e a reação à FA foi mais intensa na porção supra-nuclear comparada aos grupos UChA e controle. Também foram observadas marcações pontuais no tecido conjuntivo subjacente e na camada muscular (Fig. 1L).

A região das fímbrias (F) dos ratos do grupo controle apresentou grande quantidade de dobras da mucosa (Fig. 2D) e características semelhantes às descritas para a região do Inf nas colorações HE (Fig. 2A) e AT (Fig. 2D). A reação ao PAS apresentou-se pontual na porção infra-nuclear das CC (Fig. 2G). A reação à FA foi similar à região de Inf para o mesmo grupo (Fig. 2J).

A região das F dos ratos UChA apresentou menor quantidade e distribuição irregular das dobras da mucosa comparada ao controle (Fig. 2E). As respostas aos corantes HE (Fig. 2B) e AT (Fig. 2E) apresentaram-se heterogêneas. O epitélio apresentou lacunas com conteúdo ou não e grandes vacúolos (Fig. 2B). De maneira geral, os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao controle e, em HE, o conjunto de corpúsculos basais das CC não formou linha nítida na superfície apical como no grupo controle para as regiões de Inf e F (Fig. 2B). A reação ao PAS apresentou-se acentuada e pontual na porção infra-nuclear

das CC, semelhante à região de Inf para o mesmo grupo (Fig. 2H). O tecido apresentou-se retraído e a reação à FA foi intensa e pontual na porção supra-nuclear das células (Fig. 2K).

A região das F dos ratos UChB apresentou vacúolos e lacunas maiores em grandes quantidades com conteúdo ou não (Fig. 2C). As respostas aos corantes HE (Fig. 2C) e AT (Fig. 2F) apresentaram-se heterogêneas. Em AT, o epitélio apresentou aspecto diafanizado (com aparente atrofia das células) (Fig. 2F). Os núcleos apresentaram-se condensados e a formação da linha na superfície apical das CC foi semelhante ao UChA. A reação ao PAS foi pontual na porção supra-nuclear e mais fraca comparada ao UChA (Fig. 2I). O tecido apresentou retração maior e a reação à FA foi mais intensa na porção supra-nuclear comparada aos grupos UChA e controle e extensiva em pontos do tecido conjuntivo subjacente (Fig. 2L).

MET

O epitélio do Inf do grupo controle apresentou CC, predominantemente, e CS. As CC apresentaram formas cilíndricas característica, com cílios longos inseridos em corpúsculos basais localizados próximos à extremidade apical da membrana plasmática (Fig. 3A). As CC apresentaram concentrações de mitocôndrias em sua porção apical e infra-nuclear (Fig. 3B). Os núcleos das CC apresentaram-se regulares e alongados (Fig. 3B). Também foram observados aparelho de Golgi e retículo endoplasmático rugoso em quantidade.

Na região do Inf dos ratos UChA, o epitélio apresentou CS com microvilos escassos (Fig. 3C) e predomínio de CC. Os núcleos das CC apresentaram-se com formato regular alongado (Fig. 3C,F), sem chanfraduras, e o citoplasma com mitocôndrias não preservadas e edemaciadas na porção apical (Fig. 3D) e perinuclear (Fig. 3F). A lesão da mitocôndria apresentou um padrão: da extremidade para o centro da organela. Gotas lipídicas foram observadas com frequência nas porções infra e perinuclear das CC (Fig. 3F). As CS

apresentaram-se mais delgadas e elétron-densas comparadas às CC (Fig. 3C). Corpos lamelares, vesículas com conteúdo elétron-denso e cisternas dilatadas foram observadas (Fig. 3E).

A região do Inf dos ratos UChB apresentou-se com CS escassas e predomínio de CC. As CC apresentaram-se elétron-lucentes (Fig. 4A) comparadas ao grupo UChA, enquanto os corpúsculos basais e a heterocromatina apresentaram alto grau de elétron-densidade. Mitocôndrias não preservadas e edemaciadas estiveram presentes em grande quantidade na porção apical das CC (Fig. 4A). As membranas do aparelho de Golgi estiveram preservadas (Fig. 4A), assim como pequenas vesículas. Não obstante, núcleos de células em processo de morte foram observados na luz do epitélio (Fig. 4B). As CS apresentaram gotas lipídicas pequenas distribuídas na porção infra-nuclear, inúmeras mitocôndrias não preservadas e edemaciadas, corpos lamelares e cisternas dilatadas (Fig. 4C). Corpos multivesiculados também foram observados em algumas células. CS apresentaram-se em processo degenerativo, com mitocôndrias não preservadas e edemaciadas, elétron-densidade alterada, vesículas e com conteúdo citoplasmático na luz do epitélio (Fig. 4D).

Em MET, torna-se difícil o isolamento da porção das fimbrias. Para garantir a obtenção dessa porção, coletou-se o conjunto: infundíbulo + fimbrias (Inf + F) dos diferentes grupos (UChA, UChB e controle).

O epitélio do conjunto Inf + F do grupo controle apresentou CS escassas e predomínio de CC. As CC apresentaram mitocôndrias localizadas, principalmente, na porção apical (Fig. 5A), mas inúmeras mitocôndrias estiveram presentes na porção infra-nuclear (Fig. 5B). Os núcleos das CC apresentaram formato regular alongado (Fig. 5A,B). As CS apresentaram grânulos de secreção e núcleo com formato alongado regular.

O epitélio do conjunto Inf + F do grupo UChA apresentou CC, predominantemente, e CS. As CC apresentaram alterações semelhantes às da região de Inf do mesmo grupo. As CS apresentaram-se atrofiadas, com microvilos curtos e escassos e cisternas dilatadas (Fig.

5C). Os núcleos apresentaram formato irregular (Fig. 5C) e lacunas foram observadas entre CS (Fig. 5D). Inúmeras gotas lipídicas (Fig. 5E,F), corpos lamelares (Fig. 5F) e mitocôndrias preservadas (Fig. 5E,F) foram observadas por todo o citoplasma. Escassos grânulos de secreção foram observados nessa porção.

O epitélio do conjunto Inf + F do grupo UChB apresentou CS escassas e predomínio de CC. As CC apresentaram inúmeras mitocôndrias não preservadas e edemaciadas (Fig. 6A), além de inúmeras gotas lipídicas (Fig. 6B). Os núcleos das CC apresentaram formato irregular com chanfraduras (Fig. 6B). As CS apresentaram grande quantidade de vacúolos distribuídos pelo citoplasma (Fig. 6C). Assim como as CC, os núcleos das CS apresentaram formato irregular com chanfraduras. Grande quantidade de gotas foi observada na porção supra-nuclear (Fig. 6C). Escassos grânulos de secreção foram observados nessa porção (Fig. 6D).

MEV

O epitélio do Inf do grupo controle apresentou homogeneidade em altura (Fig. 7A) com CC, predominantemente, e CS.

Na região do Inf dos ratos UChA também foi observada homogeneidade da altura do epitélio (Fig. 7D).

A região do Inf dos ratos UChB apresentou CC cujos cílios estiveram distribuídos em grupos orientados em uma mesma direção (Fig. 7F), formando o aspecto de pêlos escovados (Fig. 7E,F), padrão observado somente nos animais do grupo UChB. Algumas porções do epitélio apresentaram-se destituídas de cílios (Fig. 7E). Gotas gigantes (Fig. 7G) também foram observadas entre as dobras do epitélio.

As F caracterizam-se pelo prolongamento das dobras longitudinais do Inf constituídas somente pela camada mucosa (Fig. 7C). Em sua porção final, o Inf apresenta-se envolvido

externamente pelas dobras longitudinais das F. Essa visão ocorre porque o Inf termina abrindo-se em F, relacionadas com o ovário (Fig. 7B).

O epitélio das F do grupo UChA apresentou abundância de gotas lipídicas de tamanho e distribuição diferentes por toda a célula, assim como gotas gigantes na lâmina própria e na luz do epitélio (Fig. 7H).

O epitélio das F do grupo UChB apresentou altura homogênea (Fig. 7J) com CS escassas e predomínio de CC. Da mesma forma que o Inf dos ratos UChB, os cílios apresentaram o aspecto de pêlo escovado (Fig. 7J,K) e gotas lipídicas de tamanhos diferentes sobre o epitélio (Fig. 7L). Algumas porções do epitélio também se apresentaram destituídas de cílios.

Morfometria da Tuba Uterina

Áreas citoplasmática e nuclear da tuba uterina distal:

Os grupos tratados (UChA e UChB) apresentaram menor área citoplasmática e nuclear comparado ao grupo controle para as regiões de Inf e F, independente do tipo celular analisado (CS ou CC). A análise de um mesmo grupo tratado mostrou que a área citoplasmática das células secretoras da região de Inf apresentou-se menor comparada à área citoplasmática das células ciliadas da mesma região e às células ciliadas da região das F, enquanto que para o grupo controle houve diferença significativa das áreas citoplasmáticas tanto entre as diferentes regiões quanto entre os tipos celulares analisados. Portanto, conclui-se que as CS apresentam áreas citoplasmáticas menores comparadas às CC. Quando analisada a área nuclear de um mesmo grupo tratado, não se observou diferença entre regiões e entre tipos celulares. A área nuclear do grupo controle apresentou comportamento semelhante ao da área citoplasmática do mesmo grupo (Tabela 1).

Altura das células epiteliais da tuba uterina distal:

Os grupos tratados (UChA e UChB) apresentaram menor altura das células epiteliais comparados ao grupo controle para as regiões de Inf e F, independente do tipo celular analisado (CS ou CC). Quando analisada a altura das células epiteliais do grupo UChA, não se observou diferença entre regiões e entre tipos celulares (Tabela 2).

Discussão

Nas regiões de Inf e F dos grupos tratados, observou-se menor quantidade e distribuição irregular de dobras epiteliais em direção à luz comparada ao grupo controle. As colorações HE e AT apresentaram-se heterogêneas, sendo que o grupo UChB apresentou epitélio com aspecto diafanizado e aparente atrofia das células em AT. A análise citomorfométrica da tuba uterina distal comprovou que tanto as áreas citoplasmática e nuclear quanto a altura das CS e CC (Inf) e CC (F) dos grupos tratados foram menores comparadas ao controle. As células apresentaram vacúolos e lacunas grandes com conteúdo ou não em seu interior. As lacunas caracterizaram-se por espaços no interior do epitélio formados pelo rearranjo das células, possivelmente, na tentativa da manutenção da integridade da mucosa, comprovada através da heterogeneidade da altura do epitélio a partir da lâmina própria. A presença de conteúdo em seu interior foi indicativa do isolamento de restos celulares (produtos do metabolismo celular). Os núcleos apresentaram-se gradativamente mais condensados, comparativamente do grupo UChA para o UChB. A tuba uterina proximal (intramural, istmo e ampola) do rato, principalmente na região do istmo, apresenta intensa reação ao corante PAS devido as glicoproteínas presentes na extremidade apical e ao glicocálix das CS. Na tuba uterina distal, a reação ao PAS do grupo controle apresentou-se como pontos de marcações esporádicos pelo citoplasma das células. Eventualmente, a reação ao PAS é positiva a tipos específicos de lipídios (Pearse, 1972). No gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), grupos de gotas lipídicas de tamanho variável foram observadas na porção infra-nuclear das regiões do istmo e do Inf das CS da tuba uterina (Almeida, 2000). Estruturas semelhantes foram descritas nas CS das F do rato (Abe, 1994) e do hamster dourado (Abe e Oikawa, 1991). Gotas compostas de lipídios neutros têm sido descritas no epitélio da tuba uterina (Wordinger et al., 1977; Henault e Killian, 1993). Os tipos mais

comuns de inclusões lipídicas são as gotas compostas de triglicérides, normalmente esféricas, mas que podem apresentar-se de forma irregular após fixação e desidratação. Geralmente, as gotas lipídicas nas células atuam como reserva de energia ou fornecem cadeias curtas de carbono, utilizadas na biossíntese da membrana plasmática (Fawcett, 1967). A reação ao PAS diferiu do grupo UChA para o UChB, apresentando-se acentuada e pontual no citoplasma das células, principalmente na porção infra-nuclear do grupo UChA, e também pontual, mas menos acentuada, na porção supra-nuclear das células do grupo UChB. Sugere-se que a reação positiva ao PAS, principalmente do grupo UChA, seja devido à presença de gotas lipídicas.

A reação à FA da região do Inf do grupo UChA apresentou-se intensa na porção supra-nuclear, mas não atingindo as extremidades apicais das células, assim como a do grupo controle. No grupo UChB, o tecido apresentou aspecto de retração e a reação à FA foi mais intensa na porção supra-nuclear comparada aos grupos UChA e controle e, foram observadas marcações pontuais no tecido conjuntivo subjacente e na camada muscular. Na região das F, constatou-se que a retração do tecido adquiriu proporções crescentes do grupo UChA para o UChB e, a reação à FA foi mais intensa no grupo UChB comparada aos grupos UChA e controle e, extensiva em pontos do tecido conjuntivo subjacente. Segundo Bull et al. (2001), cinco classes importantes de fosfatases ácidas são encontradas no homem em: lisosomos, eritrócitos, macrófagos, osteoblastos e na próstata. Os lisosomos estão envolvidos na quebra enzimática de material fagocitado e são também responsáveis pela degradação de organelas celulares degeneradas (autofagia). Das enzimas que o lisosomo contém, a fosfatase ácida tem sido considerada uma das mais importantes e, portanto, sua atividade tem sido utilizada como um marcador histológico lisosomal e sorológico de doenças (Bancroft e Stevens, 1990; Bull et al., 2001). Embora a reação à FA não seja específica exclusivamente de lisosomos, podendo marcar inclusive grânulos de secreção dependendo da sua natureza, a reação positiva observada na tuba uterina distal foi indicativa da presença de grande número de lisosomos localizados na porção supra-nuclear, mas não atingindo as extremidades apicais das CS (local em que ocorre maior incidência de

grânulos de secreção) e CC. Os lisosomos estiveram presentes em maior número nos grupos tratados comparado ao controle, sendo que no grupo UChB foram extensivos em pontos do tecido conjuntivo subjacente e na camada muscular.

O citoplasma das CC na região do Inf do grupo UChB apresentou-se elétron-lucente. Mitocôndrias não preservadas e edemaciadas estiveram presentes em grande quantidade, principalmente na porção apical das CC. Constatou-se que a degeneração adquiriu proporções crescentes do grupo UChA para o UChB, demonstrada pelo aumento das cisternas dilatadas e dos corpos lamelares. CS apresentaram-se em processo degenerativo, com mitocôndrias não preservadas e edemaciadas, elétron-densidade alterada, vesículas, e conteúdo citoplasmático na luz do epitélio. Escassos grânulos de secreção foram observados comparados ao controle. Embora o núcleo tivesse mantido o formato regular e o aparelho de Golgi o aspecto normal, constatou-se aumento do número de gotas lipídicas, demonstrando, provavelmente, metabolismo celular alterado devido à ação do álcool. Núcleos de células em processo de morte foram observados na luz do epitélio. Infere-se que as células estejam sofrendo desequilíbrio osmótico, indicado pelo processo degenerativo responsável pela morte celular.

Assim como na região de Inf, o conjunto Inf + F dos grupos tratados apresentou predomínio de CC. As CC do grupo UChB apresentaram maior quantidade de gotas lipídicas em relação ao grupo UChA e núcleos de formato irregular com chanfraduras. As CS apresentaram-se atrofiadas, com microvilos curtos e escassos, grande quantidade de vacúolos distribuídos pelo citoplasma e cisternas dilatadas. Os núcleos apresentaram formato irregular com chanfraduras e lacunas foram observadas entre CS, além de gotas lipídicas, corpos lamelares e escassos grânulos de secreção comparados ao controle.

As tubas uterinas dos grupos alcoólicos UChA e UChB confirmaram a presença de gotas lipídicas nas células epiteliais, em concordância com os resultados de Martinez et al. (1999) em tubas uterinas de ratos Wistar após ingestão crônica de etanol. Essas gotas eram

esféricas, de tamanhos e localização diferentes e, estiveram presentes em grande número. Sugere-se que as gotas gigantes presentes na luz do epitélio tenham sido formadas pelo agrupamento de gotas menores extravasadas pelas células lesadas na tentativa da homeostase.

As CS da tuba uterina produzem e secretam ativamente proteínas e glicoproteínas na luz da tuba uterina (Oliphant, 1986; Hunter, 2002; Bhatt et al., 2004), formando o fluido, juntamente com o soro do transudato seletivo (Leese, 1988; Leese *et al.*, 2001). Alguns desses produtos de secreção possuem importante papel nos eventos reprodutivos (Hunter, 1994; Gandolfi, 1995; Malette et al., 1995). Por sua vez, as CC são responsáveis pelo transporte dos oócitos no interior da tuba uterina (Odor e Blandau, 1973).

Infer-se que, devido às alterações dos cílios e microvilos, a qualidade, a renovação e o transporte do fluido produzido pelas células da tuba uterina distal estejam alterados, assim como o transporte, promovido pelos cílios, dos oócitos liberados durante a ovulação. Infer-se ainda que, devido às alterações observadas nas células epiteliais resultantes da formação de vacúolos encontrados em abundância distribuídos por toda a célula, cisternas do retículo endoplasmático dilatadas, mitocôndrias não preservadas e, a presença de grande número de gotas lipídicas e lisossomos, relacionados com a degradação de organelas celulares degeneradas, acredita-se que o álcool induza inicialmente morte celular diferente da apoptose. No entanto, esse tipo de morte celular de mecanismo desconhecido e a apoptose, definida com base em padrões específicos de mudanças morfológicas de células em processo de morte (Kerr et al., 1972), não devem ser considerados como fenômenos mutuamente exclusivos. Mais do que isso refletem o alto grau de flexibilidade na resposta das células às mudanças das condições impostas pelo meio, tanto fisiológicas como patológicas, no caso induzidas pelo álcool. Conclui-se que devido às alterações morfológicas e, conseqüentemente, funcionais o processo reprodutivo desses animais esteja comprometido.

Referências Bibliográficas

Abe H (1994) Regional variations in the ultrastructural features of secretory cells in the rat oviductal epithelium. *Anat Rec* 240: 77-85.

Abe H (1996a) Immunocytochemical evidence that a specialized region of the rat oviduct secretes an oviduct specific glycoprotein. *J Anat* 188: 333-9.

Abe H (1996b) The mammalian oviductal epithelium: regional variations in citological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol* 11: 743-68.

Abe H, Oikawa T (1991) Regional differences in the ultrastructural features of secretory cells in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductal epithelium. *J Anat* 175: 147-58.

Almeida CCD (2000) Ciclo estral, histologia e ultra-estrutura da tuba uterina do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) [Dissertação]. Botucatu (SP): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Bancroft JD, Stevens A (1990) Cytoplasmic granules, organelles and special tissues. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. Avon: Bath Press.

Banzatto AD, Kronka SN (1989) *Experimentação agrícola*. Jaboticabal: Funep.

Bareither ML, Verhage HG (1981) Control of the secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. *Am J Anat* 162: 107-18.

Barka T (1960) A simple azo dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *Nature* 187: 248.

Barriere P, Thibault E, Jean M (2002) Role of Fallopian tube in fertilization. *Rev Prat* 52: 1757-61.

Bhatt P, Kadam K, Saxena A, Natraj U (2004) Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. *Indian J Exp Biol* 42: 1043-55.

Bo WJ, Krueger WA, Rudeen PK, Symmes SK (1982) Ethanol-induced alterations in the morphology and function of the rat ovary. *Anat Rec* 202: 255-60.

Buhi WC, Alvarez IM (2003) Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. *Theriogenology* 60: 225-38.

Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelnos PN (2001) Demystified-acid phosphatases. *J Clin Pathol Mol Pathol* 55: 65-72.

Bursch W, Ellinger A, Kinzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tomosifen and ICI164384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17: 1595-607.

Burstone MS (1958) Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. *J Nat Cancer Inst* 21: 523.

Fawcett DW (1967) Lipid. In: *An Atlas of fine structure, the Cell: its organelles and inclusions*. Philadelphia: Saunders, p.307-18.

Gandolfi F (1995) Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Microsc Res Tech* 32: 1-12.

Henault MA, Killian GJ (1993) Neutral lipid droplets in bovine oviductal epithelium and lipid composition of epithelial cell homogenates. *J Dairy Sci* 76: 691-700.

Hochgraf PB, Zilberman ML, De Andrade A (1995) Women alcoholics – social, demographic and clinical characteristics in a Brazilian sample. *Alcohol Alcohol* 30: 427-32.

Hunter RHF (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 39: 176-81.

Hunter RH (2002) Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Domest Anim* 37: 186-90.

Johnson RA, Wichern DW (1998) *Applied multivariate statistical analysis*. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: A basic histological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.

Killian GJ (2004) Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 82-83: 141-53.

Laura IA, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE (2003) Ultrastructural and morphometric analysis on the ovary of Wistar rats after chronic ethanol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35: 167-76.

Leese HJ (1988) The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* 82: 843-56.

Leese HJ, Tay JJ, Reischl J, Downing S (2001) Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121: 339-46.

Les Dees W, Skelley CW (1990) Effects of ethanol during the onset of female puberty. *Neuroendocrinology* 51: 64-9.

Malette B, Paquette Y, Merlen Y, Bleau G (1995) Oviductins possess chitinase and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 41: 384-97.

Mardones J, Segovia N, Hederra A (1953) Heredity of alcohol preferente in rats:II. Coefficient of heredity. *Q J Stud Alcohol* 14: 1-2.

Martinez M, Branco Jr AC, Cagnon VHA, Mello Jr W, Garcia PJ, Martinez FE (1999) Ultrastructural changes on the epithelial cells of uterine tubes os Wistar rats after chronic ethanol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31: 273-8.

Odor DL, Blandau RJ (1973) Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. *Fertil Steril* 24: 292-300.

Odor DL, Gaddum-Rosse P, Rumery RE (1983) Secretory cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*, during the menstrual cycle and after estrogen treatment. *Am J Anat* 166: 149-172.

Oliphant G (1986) Biochemistry and immunology of oviductal fluid. In: Siegler, AM, editor. *The Fallopian tube: basic studies and clinical contributions*. Mount Kisco: Futura. p.129-45.

Palter SF, Mulayim N, Senturk L, Arici A (2001) Interleukin-8 in the human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2660-7.

Reynolds ES (1963) The use of lad citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 71: 208.

Runza TB (2004) Modelos animais e alcoolismo [Monografia]. Botucatu (SP): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Uchiyama Y (1995) Apoptosis: The history and trends of its studies. *Arch Histol Cytol* 58: 127-37.

Van Thiel DH, Gavaler JS, Lester R (1977) Ethanol: a gonadal toxin in the female. *Drug Alcohol Depend* 2: 373-80.

Watson ML (1958) Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 475.

Wordinger RJ, Dickey JF, Ellicott AR (1977) Histochemical evaluation of the lipid droplet content of bovine oviductal and endometrial epithelial cells. *J Reprod Fertil* 49: 113-4.

Fig. 1. Fotomicrografias da região do Inf dos ratos controle, UChA e UChB. Barra=21µm.

- A)** Inf dos ratos controle: altura homogênea do epitélio (barra) a partir da lâmina própria e nítida linha na superfície apical das CC (cabeça de seta) formado pelo conjunto de corpúsculos basais. Luz do epitélio (L). HE.
- B)** Inf dos ratos UChA: vacúolos (cabeça de seta) e lacunas (seta) no interior do epitélio. Luz do epitélio (L). HE.
- C)** Inf dos ratos UChB: coloração heterogênea do epitélio, vacúolos (cabeça de seta) e lacunas (seta) com conteúdo ou não em seu interior. Luz do epitélio (L). HE.
- D)** Inf dos ratos controle: dobras longitudinais (asterisco) longas e ramificadas em direção à luz (L). AT.
- E)** Inf dos ratos UChA: menor quantidade de dobras (asterisco) em direção à luz (L), comparada ao controle, lacunas (cabeça de seta) com conteúdo ou não em seu interior e células epiteliais (barra) extravasando conteúdo para a luz (L). AT.
- F)** Inf dos ratos UChB: aspecto diafanizado do epitélio, dobras (asterisco) mais escassas em direção à luz (L) e, núcleos mais condensados (seta espessa) comparados aos grupos controle e UChA. AT.
- G)** Inf dos ratos controle: a reação apresentou-se como pontos esporádicos pelo citoplasma das células (seta delgada). Luz do epitélio (L). PAS.
- H)** Inf dos ratos UChA: reação acentuada e pontual na porção infra-nuclear das células (seta delgada). Luz do epitélio (L). PAS.
- I)** Inf dos ratos UChB: reação pontual na porção supra-nuclear (seta delgada) mais fraca comparada ao grupo UChA. Luz do epitélio (L). PAS.
- J)** Inf dos ratos controle: reação intensa na porção supra-nuclear (seta). Luz do epitélio (L). FA.
- K)** Inf dos ratos UChA: reação intensa na porção supra-nuclear (seta). Luz do epitélio (L). FA.
- L)** Inf dos ratos UChB: retração do tecido e reação muito intensa desde a porção supra-nuclear até a extremidade apical (seta) e, extensiva ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular (asterisco). Luz do epitélio (L). FA.

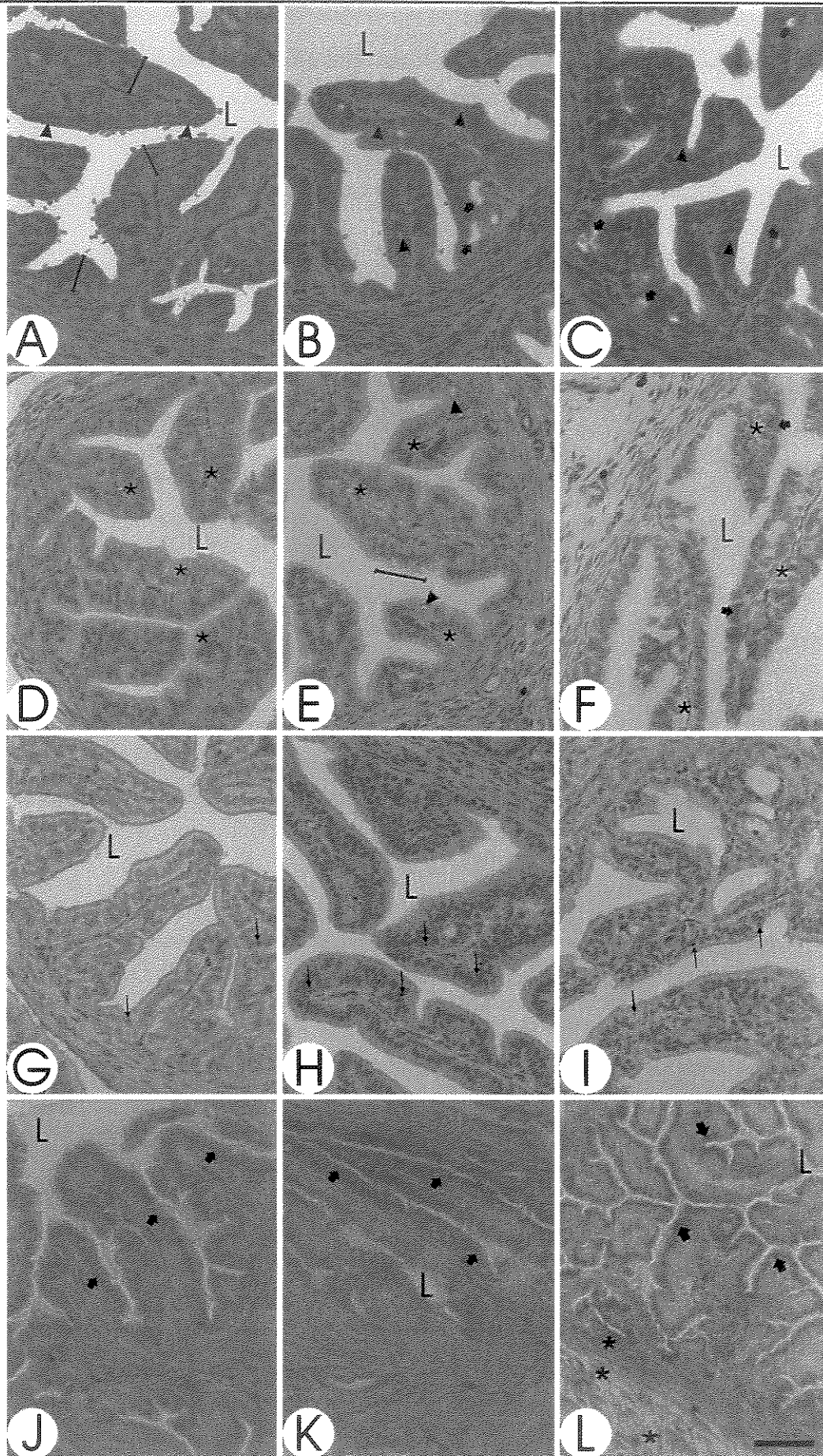


Fig. 2. Fotomicrografias da região das F dos ratos controle, UChA e UChB. Barra=21µm.

- A) F dos ratos controle: altura homogênea do epitélio (barra) a partir da lâmina própria e nítida linha na superfície apical das CC (cabeça de seta) formado pelo conjunto de corpúsculos basais. HE.
- B) F dos ratos UChA: vacúolos (cabeça de seta) e lacunas (seta) com conteúdo ou não em seu interior. HE.
- C) F dos ratos UChB: vacúolos (cabeça de seta) e lacunas (seta) com conteúdo ou não em seu interior. HE.
- D) F dos ratos controle: grande quantidade de dobras longitudinais (asterisco) longas. AT.
- E) F dos ratos UChA: menor quantidade e distribuição irregular de dobras (asterisco) longitudinais e, núcleos mais condensados (seta) comparados ao controle. AT.
- F) F dos ratos UChB: aspecto diafanizado do epitélio, dobras (asterisco) mais escassas comparadas aos grupos controle e UChA. AT.
- G) F dos ratos controle: reação pontual na porção infra-nuclear das CC (seta delgada). PAS.
- H) F dos ratos UChA: reação acentuada e pontual na porção infra-nuclear das células (seta delgada). PAS.
- I) F dos ratos UChB: reação pontual na porção supra-nuclear (seta delgada) mais fraca comparada ao grupo UChA. PAS.
- J) F dos ratos controle: reação intensa na porção supra-nuclear (seta). FA.
- K) F dos ratos UChA: aspecto de retração do tecido e reação intensa e pontual na porção supra-nuclear (seta). FA.
- L) F dos ratos UChB: retração do tecido e reação muito intensa na porção supra-nuclear, comparada aos grupos controle e UChA, e extensiva ao tecido conjuntivo subjacente (asterisco). FA.

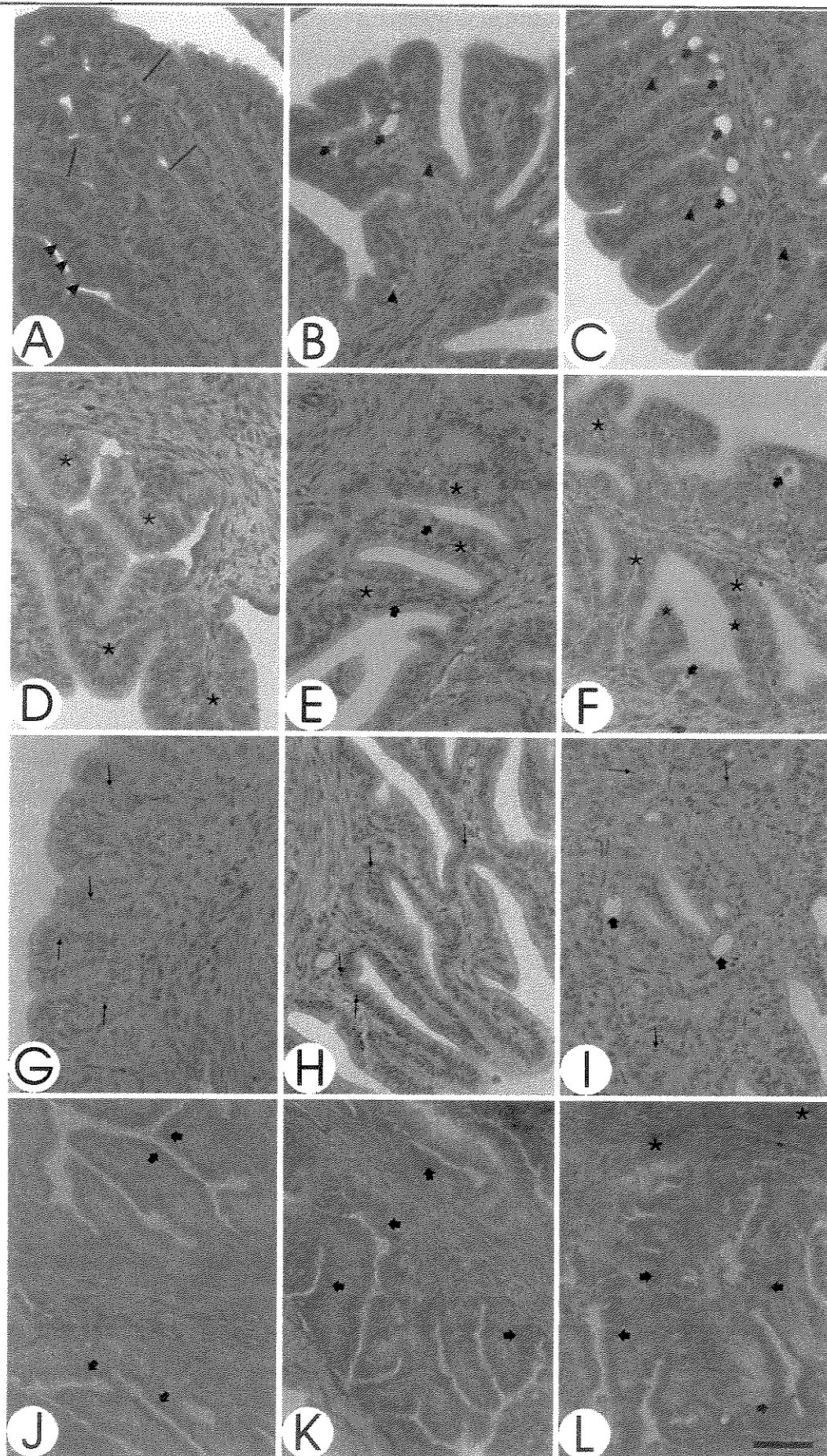


Fig. 3. Eletromicrografia de transmissão da região do Inf dos ratos controle e UChA.

- A) Inf dos ratos controle: CC: cílios (Ci) inseridos em corpúsculos basais (seta) e mitocôndrias na porção apical (asterisco). 7700X.
- B) Inf dos ratos controle: CC: mitocôndrias na porção infra-nuclear (seta) e núcleo regular alongado (N). 13200X.
- C) Inf dos ratos UChA: célula secretora (CS) com microvilos escassos (cabeça de seta) e núcleo regular alongado de células ciliadas (N). 4350X.
- D) Inf dos ratos UChA: CC: mitocôndrias edemaciadas na porção apical da célula (seta). 17000X.
- E) Inf dos ratos UChA: CS: figuras mielínicas (seta), vesículas com conteúdo elétron-denso (cabeça de seta) e cisternas dilatadas (asterisco). 13200X.
- F) Inf dos ratos UChA: CC: núcleo regular alongado (N), mitocôndrias edemaciadas (seta) e gotas lipídicas (asterisco). 7750X.

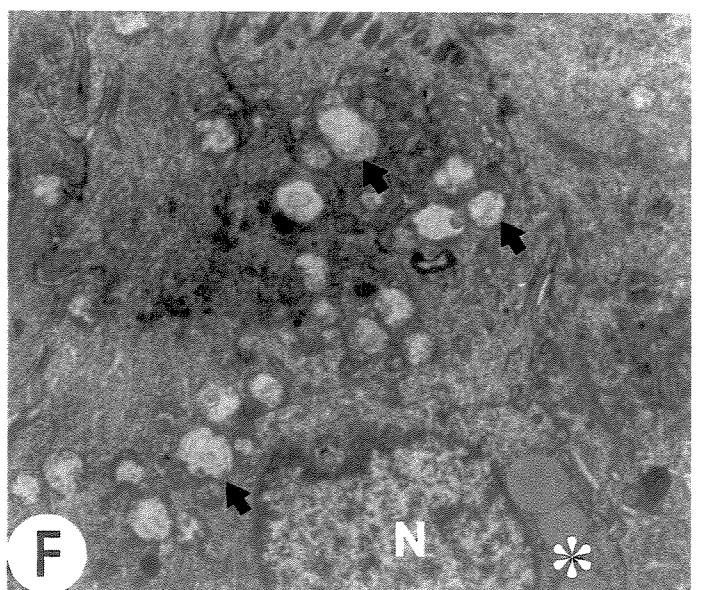
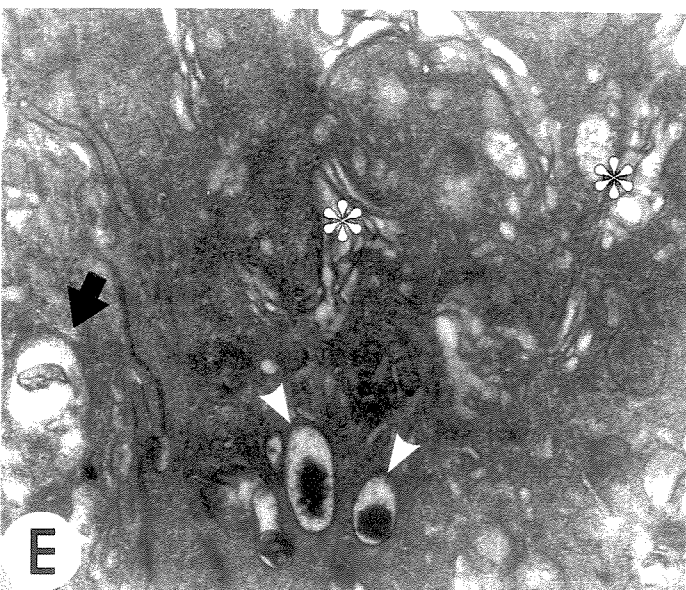
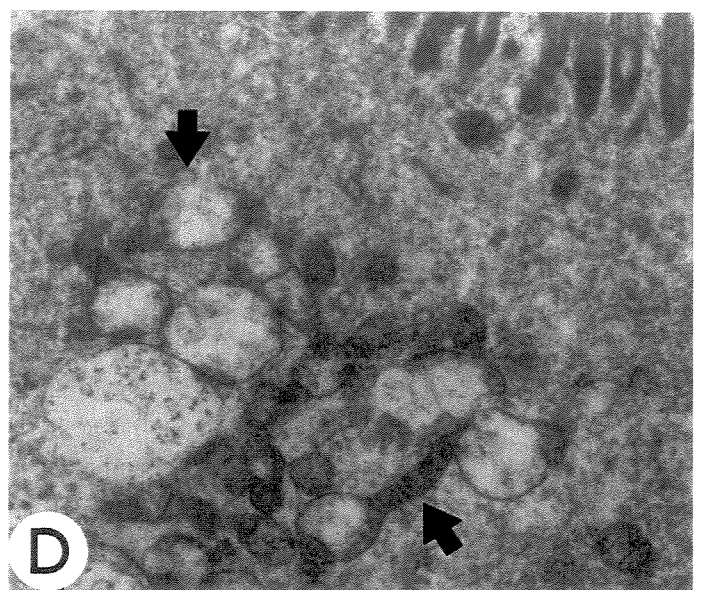
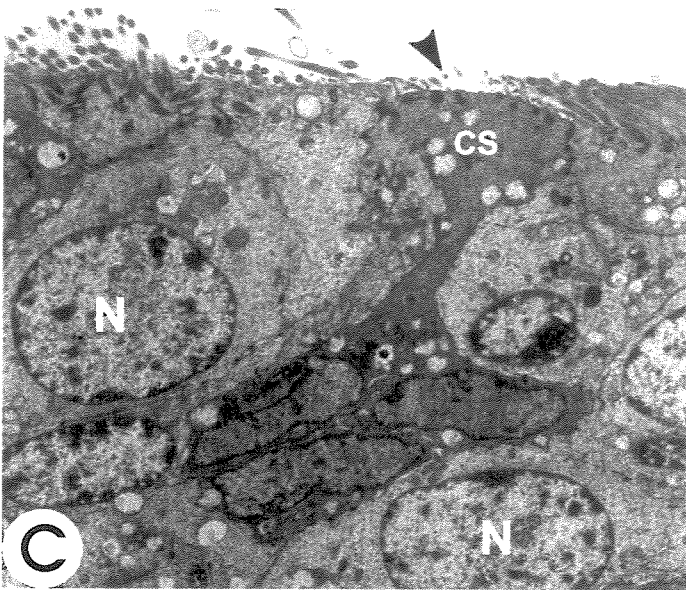
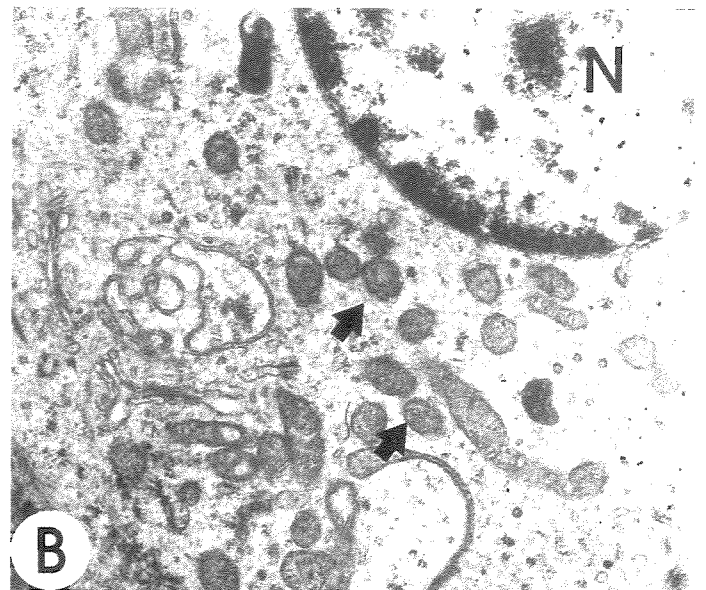
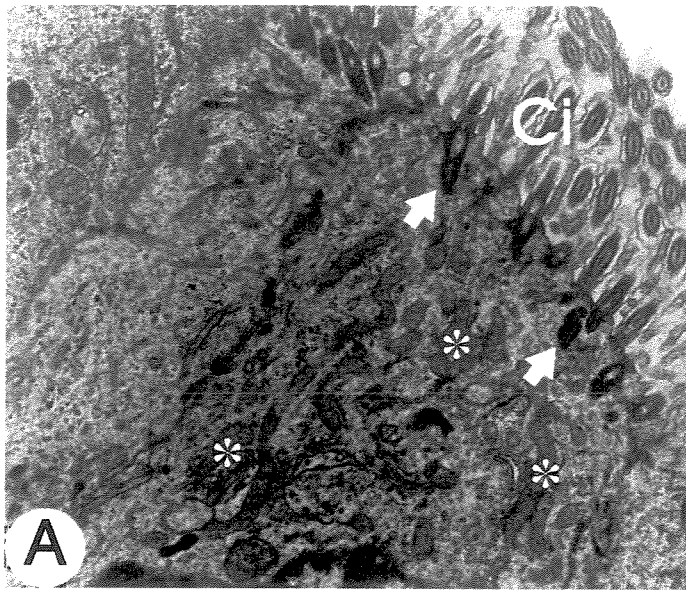


Fig. 4. Eletromicrografia de transmissão da região do Inf dos ratos UChB.

- A) CC: mitocôndrias edemaciadas (asterisco), membranas do aparelho de Golgi preservadas (seta) e vesículas pequenas (cabeça de seta). 9750X.
- B) CC: núcleo de célula morta (seta) na luz (L) do epitélio. 9750X.
- C) CS: gotas lipídicas (seta delgada), mitocôndrias edemaciadas (cabeça de seta), corpo lamelar (seta espessa) e cisternas dilatadas (asterisco). 7700X.
- D) Processo degenerativo de célula secretora (CS) com mitocôndrias edemaciadas (cabeça de seta) e perda de conteúdo citoplasmático (seta) para a luz (L) do epitélio. 17000X.

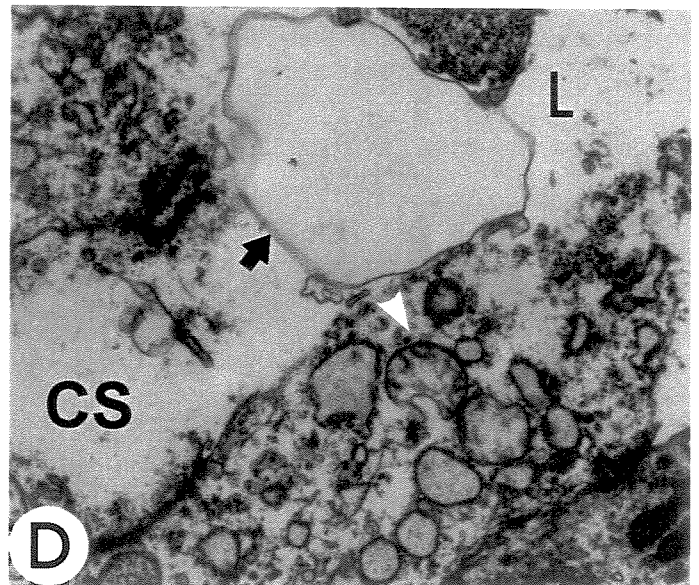
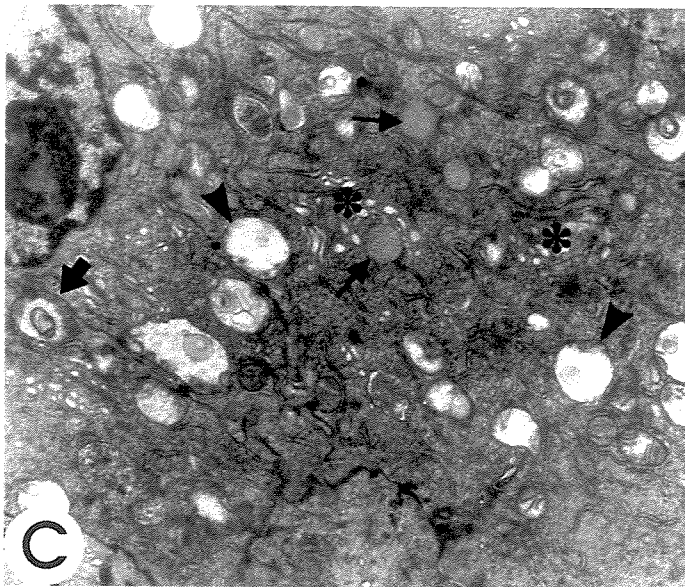
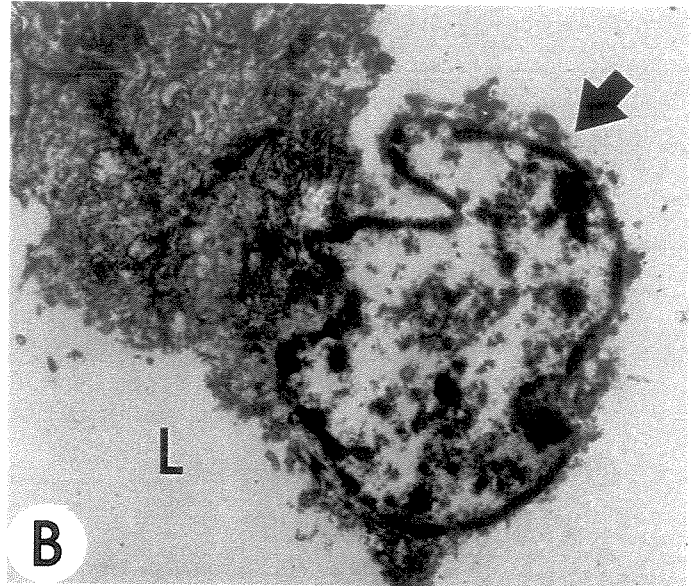
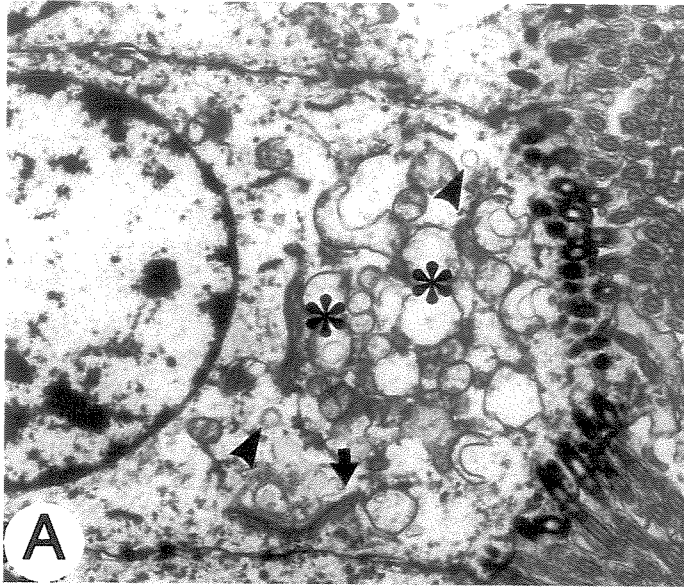


Fig. 5. Eletromicrografia de transmissão da região de Inf + F dos ratos controle e UChA.

- A)** Inf + F dos ratos controle: CC: mitocôndrias na porção apical (cabeça de seta) e núcleo regular alongado (N). 7700X.
- B)** Inf + F dos ratos controle: CC: mitocôndrias na porção infra-nuclear (cabeça de seta) e núcleo regular alongado (N). 7700X.
- C)** Inf + F dos ratos UChA: CS: microvilos curtos e escassos (cabeça de seta), cisternas dilatadas (asterisco) e núcleos irregulares com chanfraduras (N). 7700X.
- D)** Inf + F dos ratos UChA: CS: lacuna (asterisco) entre células secretoras. 3300X.
- E)** Inf + F dos ratos UChA: CC: mitocôndrias preservadas (cabeça de seta) e gotas lipídicas (seta). 13200X.
- F)** Inf + F dos ratos UChA: CC: figura mielinizada (seta), mitocôndrias preservadas (asterisco) e gotas lipídicas (cabeça de seta). 22000X.

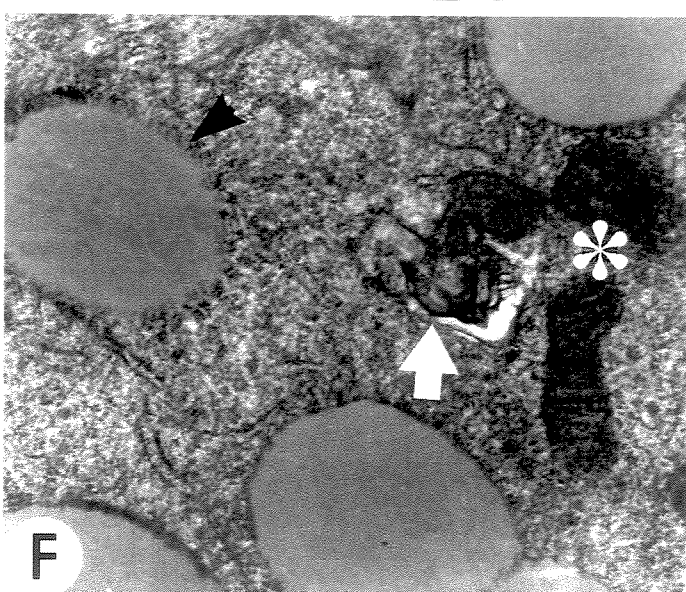
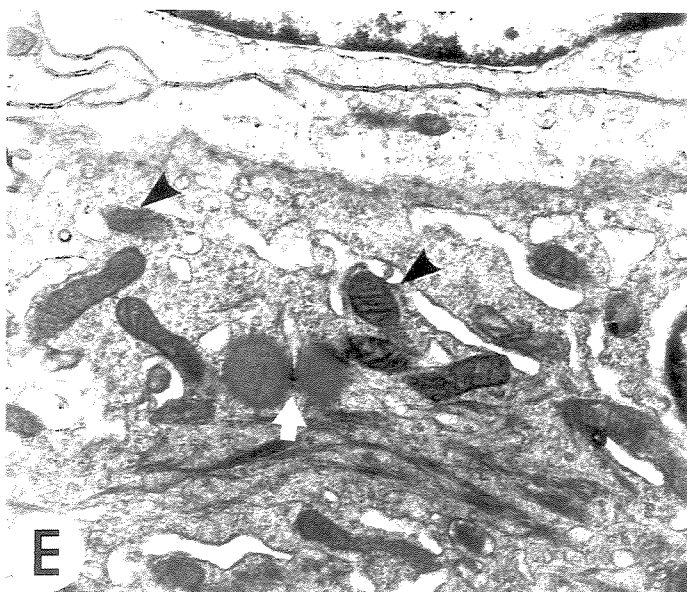
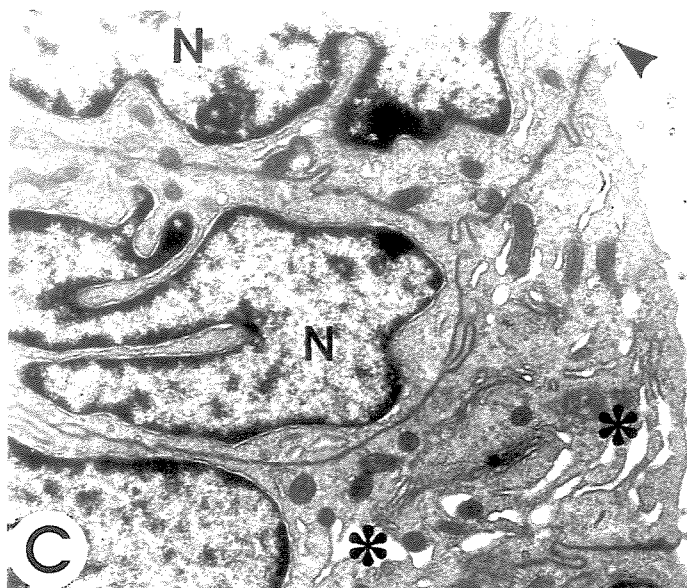
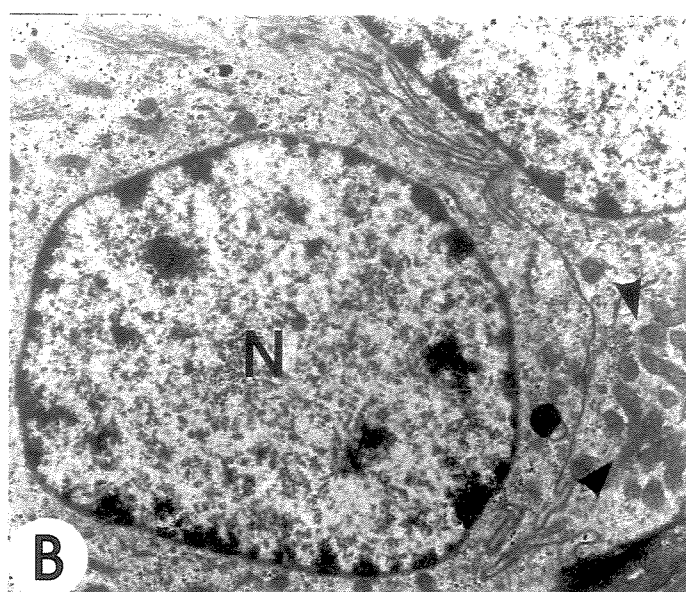
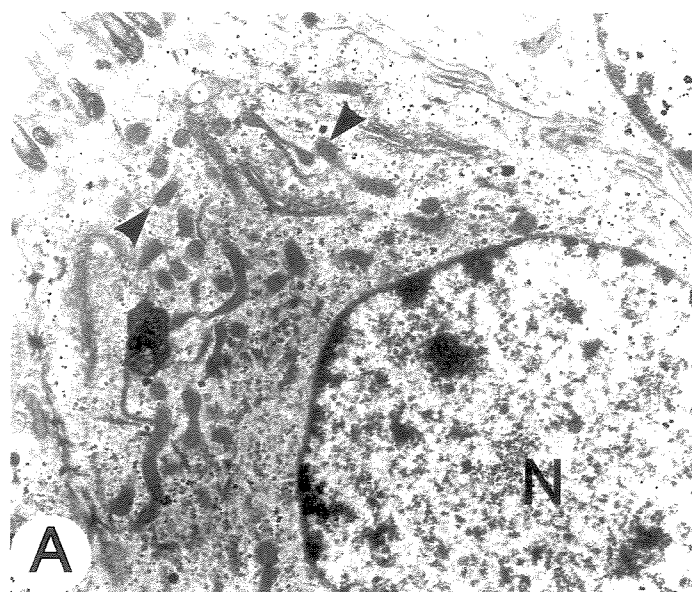


Fig. 6. Eletromicrografia de transmissão da região de Inf + F dos ratos UChB.

- A) CC: mitocôndrias edemaciadas (seta). 13200X.
- B) CC: gotas lipídicas (seta) na porção infra-nuclear e núcleo irregular com chanfraduras (N). 7700X.
- C) CS: vacúolos (asterisco) e gotas lipídicas na porção supra-nuclear (seta). 7700X.
- D) CS: grânulos de secreção escassos (seta). 7700X.

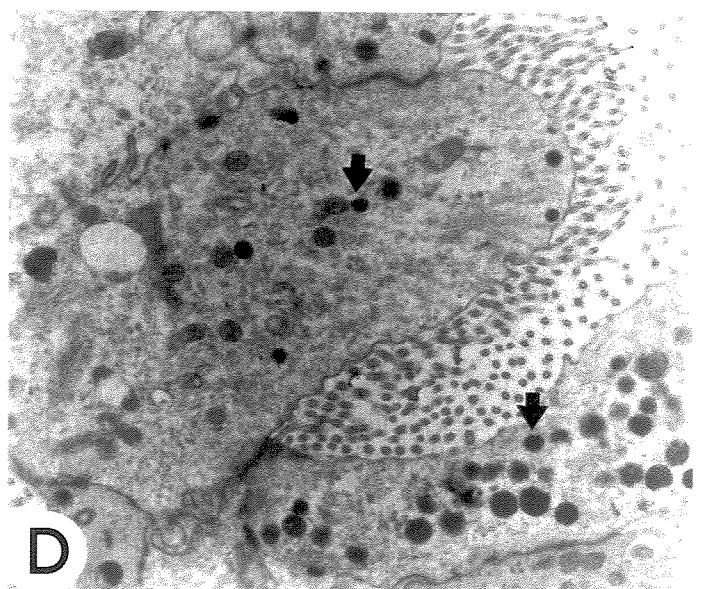
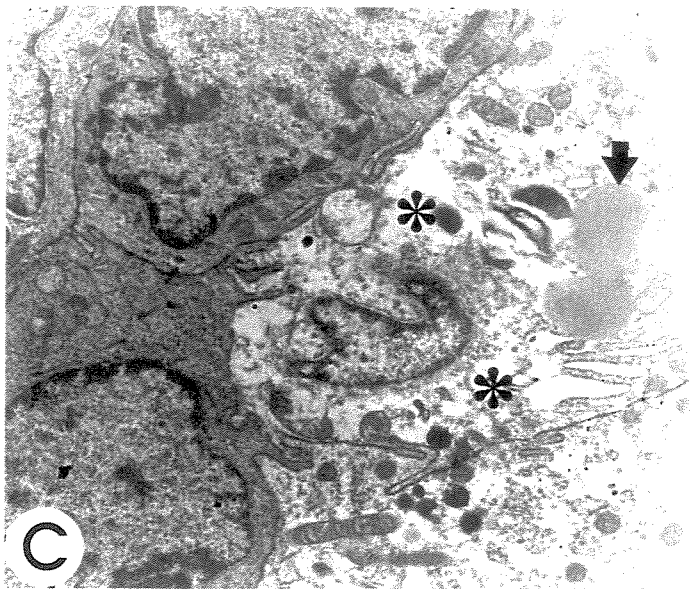
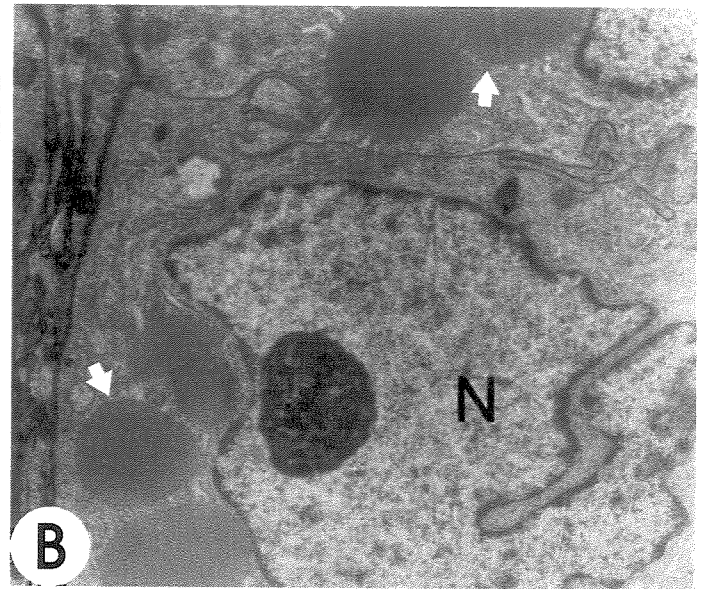
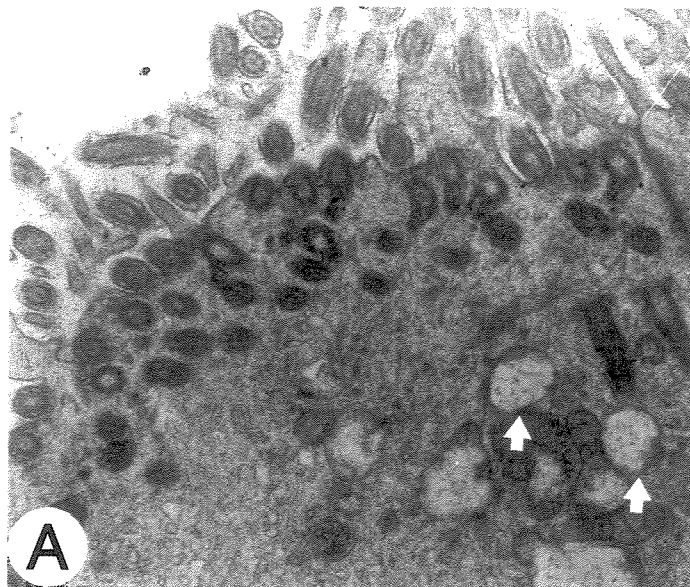


Fig. 7. Eletromicrografia de varredura das regiões de Inf e F dos ratos controle, UChA e UChB.

- A) Inf dos ratos controle: altura homogênea do epitélio ({} a partir da lâmina própria (LP) e predomínio de CC (Ci). Barra=557 μ m.
- B) Inf (asterisco) abrindo-se (seta) em F (estrela) e sua relação com o ovário (ov.). Barra=44 μ m.
- C) F dos ratos controle: CS escassas (cabeça de seta) e predomínio de CC (asterisco). Barra=196 μ m.
- D) Inf dos ratos UChA: altura homogênea do epitélio ({}). Barra=929 μ m.
- E) Inf dos ratos UChB: padrão de distribuição dos cílios, formando o aspecto de pêlos escovados, e porções destituídas de cílios (asterisco). Barra=604 μ m.
- F) Inf dos ratos UChB: grupos de cílios (asterisco) orientados em uma mesma direção. Barra=3726 μ m.
- G) Inf dos ratos UChB: gotas gigantes (seta) entre dobras do epitélio (asterisco). Barra=344 μ m.
- H) F dos ratos UChA: gotas gigantes (seta) na lâmina própria e luz do epitélio. Barra=579 μ m.
- I) F dos ratos UChA: cílios (estrela) e vacúolos (cabeça de seta) distribuídos por todo o citoplasma da célula. Barra=2317 μ m.
- J) F dos ratos UChB: Dobra longitudinal do epitélio evidenciando altura homogênea do epitélio ({} e aspecto de pêlos escovados dos cílios (asterisco). Barra=409 μ m.
- K) F dos ratos UChB: grupos de cílios (estrela) orientados em uma mesma direção e presença de vacúolos (cabeça de seta) no citoplasma das células. Barra=1214 μ m.
- L) F dos ratos UChB: Presença de vacúolos (cabeça de seta) no citoplasma das células e gota lipídica sobre o epitélio (seta). Barra=530 μ m.

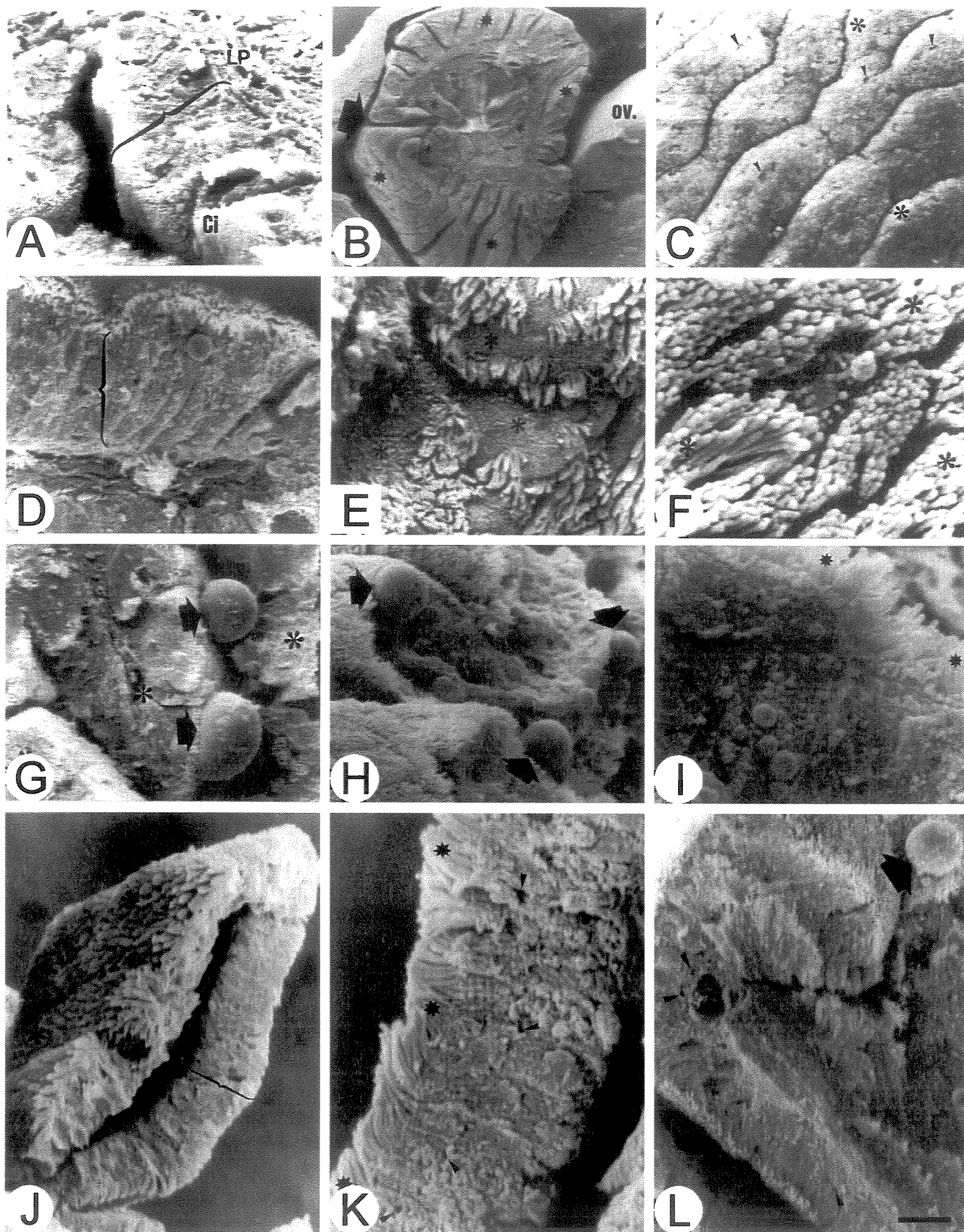


Tabela 1. Média e desvio-padrão da área do citoplasma (μm^2) e da área do núcleo (μm^2) das células secretoras (CS) e ciliadas (CC) da tuba uterina distal (regiões: infundíbulo (Inf) e fímbrias (F)) dos grupos controle (C), UChA e UChB

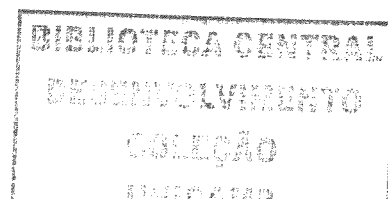
Grupo	Região		
	Inf(CS)	Inf(CC)	F(CC)
Área do citoplasma			
C	1035,17 $\pm$ 113,48b A	1400,67 $\pm$ 133,52b B	1561,50 $\pm$ 65,44b C
UChA	785,67 $\pm$ 73,59a A	1089,67 $\pm$ 58,13a B	1088,33 $\pm$ 146,30a B
UChB	700,83 $\pm$ 93,64a A	1065,50 $\pm$ 101,24a B	1061,17 $\pm$ 86,00a B
Área do núcleo			
C	498,50 $\pm$ 39,78b A	551,33 $\pm$ 29,41b B	629,33 $\pm$ 32,34b C
UChA	441,17 $\pm$ 40,19a A	444,50 $\pm$ 27,59a A	486,50 $\pm$ 43,27a A
UChB	433,50 $\pm$ 40,83a A	474,00 $\pm$ 36,70a A	503,50 $\pm$ 32,22a A

Médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente.

Tabela 2. Média e desvio-padrão da altura (μm) das células secretoras (CS) e ciliadas (CC) da tuba uterina distal (regiões: infundíbulo (Inf) e fimbrias (F) dos grupos controle (C), UChA e UChB

Grupo	Região		
	Inf(CC)	Inf(CS)	F(CC)
C	105,33 $\pm$ 8,52c B	94,83 $\pm$ 9,83b A	99,67 $\pm$ 3,45b AB
UChA	74,17 $\pm$ 4,36a A	69,00 $\pm$ 4,94a A	77,17 $\pm$ 6,24a A
UChB	81,33 $\pm$ 3,93b B	71,67 $\pm$ 4,50a A	77,33 $\pm$ 5,47a AB

Médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente.



**CICLO ESTRAL, HISTOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO DA
TUBA UTERINA PROXIMAL (Intramural, Istmo e Ampola) DA LINHAGEM DE
RATOS UChA E UChB – BEBEDORA VOLUNTÁRIA DE ETANOL**

Almeida-Francia CCD, Farje LADF, Padovani CR, Pinheiro PFF, Martinez M, Segatelli
TM, Martinez FE

RESUMO

O presente trabalho analisou o ciclo estral e as células epiteliais da tuba uterina proximal (intramural - In, istmo - I e ampola - A) da linhagem de ratos UChA e UChB, bebedores voluntários de etanol, divididos em 3 grupos: 1º) UChA de consumo voluntário médio de 6,05 g/Kg/dia de etanol a 10%; 2º) UChB de consumo voluntário médio de 8,18 g/Kg/dia de etanol a 10% e 3º) ratas Wistar (controle). Durante 20 dias seguidos procedeu-se à análise do ciclo estral através da coleta de esfregaços vaginais. Fêmeas em estro foram selecionadas para coleta e processamento dos órgãos, empregando-se técnicas microscópicas e morfométricas. Os grupos UChA e UChB apresentaram ciclo estral irregular. A região In dos ratos tratados apresentou vacúolos no citoplasma e cisternas dilatadas, núcleos com formatos irregulares e gotas lipídicas. A região do I apresentou alteração de elétron-densidade dos microvilos e distribuição irregular dos cílios, além das características citadas na região In. A região da A apresentou aumento de corpos lamelares e gotas lipídicas no citoplasma e na luz do epitélio. O processo degenerativo adquiriu proporções crescentes do grupo UChA para o UChB. Os grupos tratados apresentaram menores áreas citoplasmáticas e nucleares comparadas ao controle. Conclui-se que o etanol altera o ciclo estral e a estrutura das células epiteliais da região proximal da tuba uterina. Infere-se que, devido às alterações, os processos de capacitação e fertilização estejam comprometidos.

Palavras-chave: ciclo estral; estrutura; tuba uterina proximal; ratas UCh; etanol.

INTRODUÇÃO

O alcoolismo é o terceiro problema mais sério de Saúde Pública Mundial, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares e pelo câncer. Segundo estudos clínicos, as

mulheres alcoólicas crônicas frequentemente apresentam irregularidades menstruais (Wilsnack, 1973; Jones-Saumty *et al.*, 1981; Mendelson & Mello, 1988; Becker *et al.*, 1989), infertilidade (Wilsnack *et al.*, 1984), abortos espontâneos (Kaufman, 1997; Wolfe *et al.*, 2000; Kesmodel *et al.*, 2002) e prejuízos ao desenvolvimento fetal durante a gravidez (Green, 1974; Moskovic, 1975; Mulvihill *et al.*, 1976; Hanson *et al.*, 1976; Van Thiel *et al.*, 1977; Hugues *et al.*, 1980; Harlap & Shiono, 1980; Välimäki & Ylikahri, 1981; Halliday *et al.*, 1982; Tal *et al.*, 1985; Hamid *et al.*, 1987; Kaufman, 1997; Wolfe *et al.*, 2000; Stromland & Pinazo-Duran, 2002). Esses resultados clínicos indicam que um modelo animal de alcoolismo é necessário para avaliar os efeitos do álcool na função reprodutiva feminina sob condições controladas.

A tuba uterina é um órgão longo e enovelado, cujo grau de enovelamento varia entre as espécies. É estrutura vital e altamente especializada no processo reprodutivo das fêmeas e assume papéis importantes na reprodução animal. Portanto, as tubas uterinas são mais que um simples conduto para o transporte do oócito, dos espermatozóides, do zigoto ou embrião, do ovário para o útero. A tuba uterina, em seu estado funcional, é um órgão ativo, possibilitando o encontro dos gametas, mantendo e modulando o meio fluido dinâmico (Hafez, 1995; Abe, 1996; Lapointe & Bilodeau, 2003; Killian, 2004).

Os ratos da variedade UChA e UChB são importantes para o estudo de características únicas ao alcoolismo humano. Denominou-se UChA e UChB às linhagens de baixo e alto consumo de etanol, respectivamente (UCh = Universidade do Chile). Mardones *et al.* (1953) iniciaram os experimentos de cruzamentos consanguíneos entre ratos de consumo baixo e alto de álcool. As variedades constituem modelos raros para os trabalhos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool, tão bem quanto a apetite e a tolerância que são importantes fatores do alcoolismo humano.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivos analisar as alterações do ciclo estral e da estrutura das células epiteliais da tuba uterina proximal (Intramural, Istmo e Ampola) da linhagem de ratos UChA e UChB, bebedores voluntários de etanol, contribuindo para o entendimento das consequências do abuso do álcool na morfofisiologia do sistema genital feminino.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 112 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), adultas (4 meses), com peso médio de 280g, cujas matrizes foram importadas do biotério do Departamento de Farmacologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile. Os animais constituíram 3 grupos: 1º) ratas UChA de consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol) e consumo médio de etanol de 6,046g/Kg/dia, 2º) ratas UChB de consumo voluntário de etanol a 10% e consumo médio de etanol de 8,177g/Kg/dia e 3º) ratas Wistar de consumo voluntário de água utilizadas como controle, cedidas pelo Biotério Central do Campus de Botucatu/UNESP. As fêmeas tratadas receberam etanol durante 55 a 65 dias. Todos os animais receberam dieta sólida constituída de ração Nuvital e o protocolo experimental seguiu os princípios éticos de pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

I: Avaliação do Ciclo Estral

Foram utilizados 30 animais (10 de cada grupo) mantidos sob condições ideais de temperatura (aproximadamente 21°C) e luminosidade (12h de luz e 12h de escuro) e em caixas isoladas. Durante 20 dias seguidos foram coletados esfregaços vaginais através da utilização de cotonete umedecido em solução fisiológica que foi introduzido na vagina das fêmeas, sofrendo leve rotação. Em seguida, o material aderido ao cotonete foi espalhado sobre lâmina histológica limpa e previamente identificada com o número do animal. Procedeu-se à fixação do esfregaço com mistura de álcool-éter (1:1) e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BH-2 do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

II: Microscopia de Luz (MLuz)

A) Historesina

Foram sacrificadas no estro, após saturação anestésica com éter etílico, 21 fêmeas (7 de cada grupo). As tubas uterinas, sem separar dos ovários direitos, foram dissecadas sob microscópio cirúrgico D. F. Vasconcelos e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão

fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 6h. Os órgãos foram acondicionados em álcool 70% na geladeira, por 48h. A desidratação foi realizada em álcool 95% durante 4h e a infiltração em resina plástica “Historesin” (Reichert – Jung/Embedding Kit – Alemanha) mais álcool durante 4h. Os órgãos foram imersos em resina pura por 12h. As amostras de tecido foram incluídas e transportadas para histomoldes etiquetados (histomold - LKB – Alemanha), contendo mescla de inclusão (líquido de infiltração + endurecedor). Os histomoldes foram colocados em estufa a 60°C durante 3h. Os blocos do material incluído foram cortados com 5µm de espessura em micrótomo LEICA 2145. Os cortes foram corados com HE, azul de toluidina (AT) e ácido periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

B) Fosfatase Ácida (FA)

As tubas uterinas, sem separar dos ovários e extremidades craniais dos cornos uterinos esquerdos, foram coletadas e dissecadas. O material foi coberto com talco para a preservação do tecido e congelado em nitrogênio líquido. Os órgãos reprodutores congelados foram transferidos para câmara de criostato LEICA CM1800 Cryostat (Alemanha) a -20°C e mantidos durante 15 a 20min. Os órgãos foram colados pela extremidade cranial do corno uterino em suporte metálico, utilizando-se adesivo especial: “Tissue-Tek” (OCT – Optimal Critical Temperature). Os ovários e tubas uterinas foram seccionados com 5µm de espessura. Os cortes foram submetidos às soluções de pararosanilina hidrocloreada e nitrito de sódio a 4% e misturados com 5mg de naphtol AS – B1 (dissolvido em 0,5ml de n-n-dimetilformamida), 2,5ml de tampão veronal acetato e 6,5ml de água destilada. O pH foi ajustado para 5,0 e os cortes foram incubados a 37°C por 60min, lavados em água destilada e contrastados com metil verde. Finalmente, os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em álcool absoluto e montados no meio sintético (Burnstone, 1958; modificado por Barka, 1960). As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

III: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

21 animais (7 de cada grupo) foram sacrificados em estro após saturação anestésica com éter etílico. As tubas uterinas e os ovários direitos foram fragmentados e imersos em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 6h. Em seguida, foram pós-fixados em Tetróxido de Ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 2h no escuro. Um terceiro fixador, acetato de Uranila 0,5% em água com sacarose 13,3% foi usado por 2h. Posteriormente, foi realizada desidratação do material em série crescente de acetona (50 até 100%). Os fragmentos foram incluídos em resina (Araldite® 506). Os blocos foram trimados e os cortes de 0,5µm de espessura (semi-finos) obtidos no ultramicrotomo LBK BROMA 8800 ULTRATOME com navalha de vidro. Os cortes foram corados com azul de metileno e azur II (1:1), analisados em microscópio de luz e selecionadas áreas específicas para MET. Os blocos foram retrimados, seccionados com 60 a 80nm de espessura no ultramicrotomo LBK BROMA 8800 ULTRATOME. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), analisados e fotografados no MET PHILLIPS EM 301 do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP e LEO 900 ZEISS do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da FMB/UNESP.

IV: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As tubas uterinas, sem separar dos ovários esquerdos dos animais utilizados para MET, foram coletadas. Foram fragmentados em aproximadamente 1,0 mm de largura, imersos em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 2h. Os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de soluções de álcool (70% a 100%), levados para secar em PONTO CRÍTICO BALZERS UNION, montados em base metálica e levados ao metalizador MED 010 BALZERS UNION, onde foram recobertos com ouro. As amostras foram analisadas e fotografadas no MEV SEM-515 do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP.

V: Morfometria da Tuba Uterina

As tubas uterinas de 6 animais dos 3 grupos de estudo, utilizadas na preparação de lâminas histológicas para microscopia de luz e coradas com HE, foram utilizadas nas

análises morfométricas. Foram mensuradas as áreas nucleares, citoplasmáticas, totais (citoplasma + núcleo) e altura das células epiteliais da tuba uterina. Utilizou-se para mensuração das variáveis descritas o Sistema de Análise de Imagens Computadorizado KS-300 (Zeiss) do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP. A estatística das variáveis descritas foi realizada através da técnica da análise de variância multivariada dos perfis médios dos grupos (Johnson & Wichern, 1998) em experimentos inteiramente casualizados. A técnica de análise foi complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey para contraste entre médias dos grupos. Os resultados foram apresentados em tabelas e, todas as conclusões estatísticas foram realizadas em nível de 5% de significância. Detalhes a respeito da metodologia empregada podem ser encontrados em Banzatto & Kronka (1989).

VI: Dosagem de Hormônios

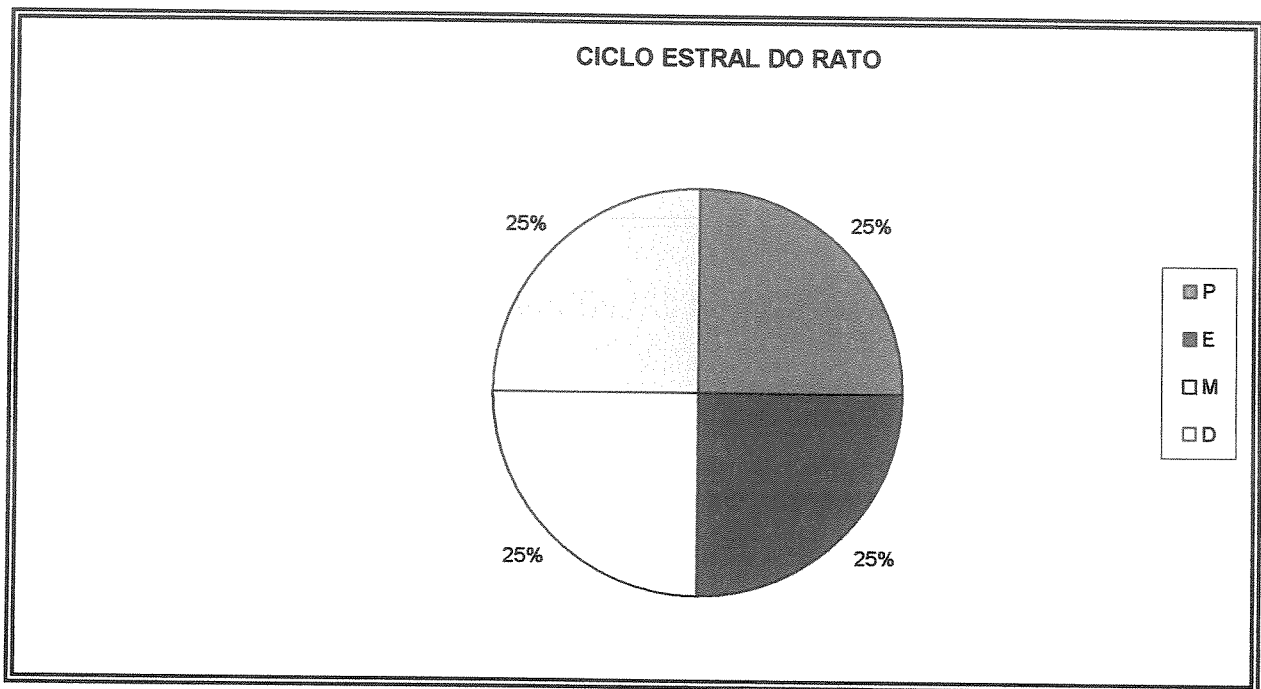
O sangue de 40 animais em estro foi coletado através da decapitação. As amostras foram enviadas aos Laboratórios de Reprodução da FMVZB/UNESP e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. As dosagens plasmáticas de estradiol, progesterona, FSH e LH foram realizadas através da técnica de radioimunoensaio de duplo-anticorpo. Foi utilizada a técnica da análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) para o modelo com uma fonte de variação (Norman & Streiner, 1994).

RESULTADOS

I: Avaliação do Ciclo Estral

O rato apresenta ciclo estral poliétrico (o ciclo estral termina num período de diestro que emerge como o proestro no ciclo estral seguinte) com quatro fases distintas (Esquema 1 e Figs. 1, 2 e 3):

Esquema 1. Fases do ciclo estral do rato.



Proestro (P): predominam células epiteliais e células queratinizadas em menor número;

Estro (E): predominam células queratinizadas (cornificadas) em grupos e ausência de leucócitos e muco;

Metaestro (M): predominam leucócitos e células queratinizadas, e infiltração de células epiteliais;

Diestro (D): predominam muco, leucócitos e células epiteliais.

Fig. 1. Fotomicrografia em esfregaços vaginais, corados com HE, das diferentes fases do ciclo estral dos ratos do grupo controle, avaliadas durante 20 dias consecutivos.

- A) Proestro.** Predomínio de células epiteliais (asterisco). 860X.
- B) Estro.** Células queratinizadas (cabeça de seta). 800X.
- C) Metaestro.** Células queratinizadas, leucócitos (estrela) e células epiteliais. 1000X.
- D) Diestro.** Leucócitos (estrela) e células epiteliais. 853X.

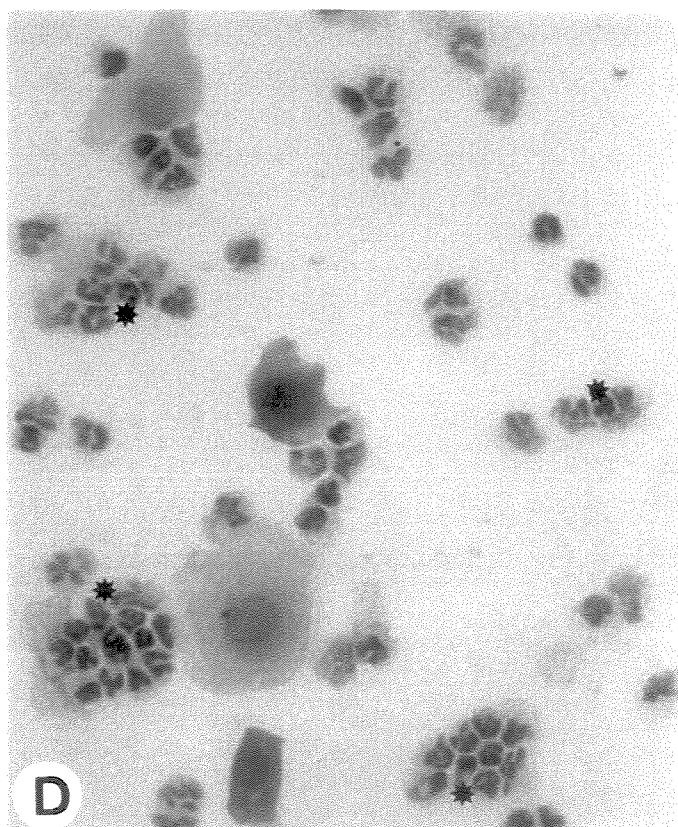
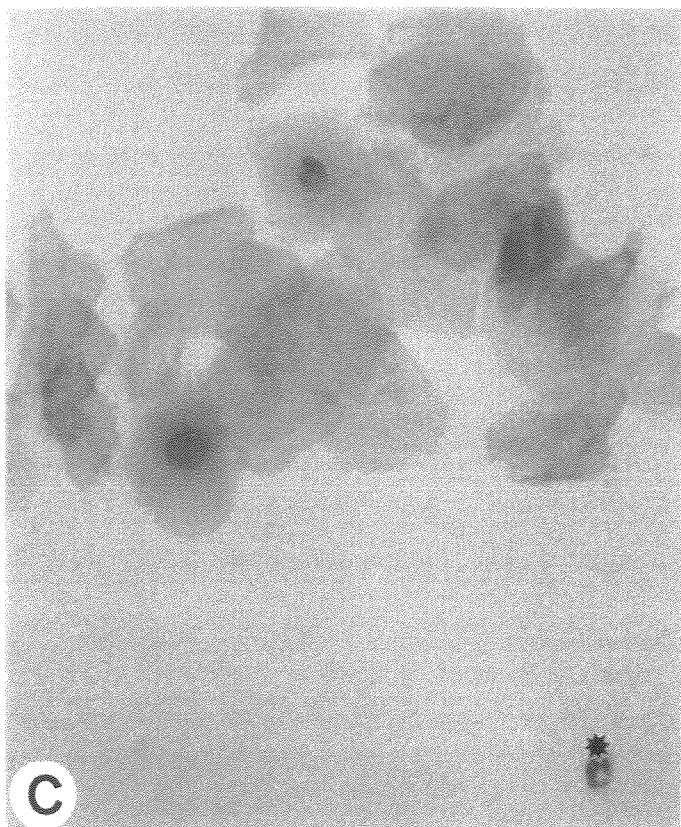
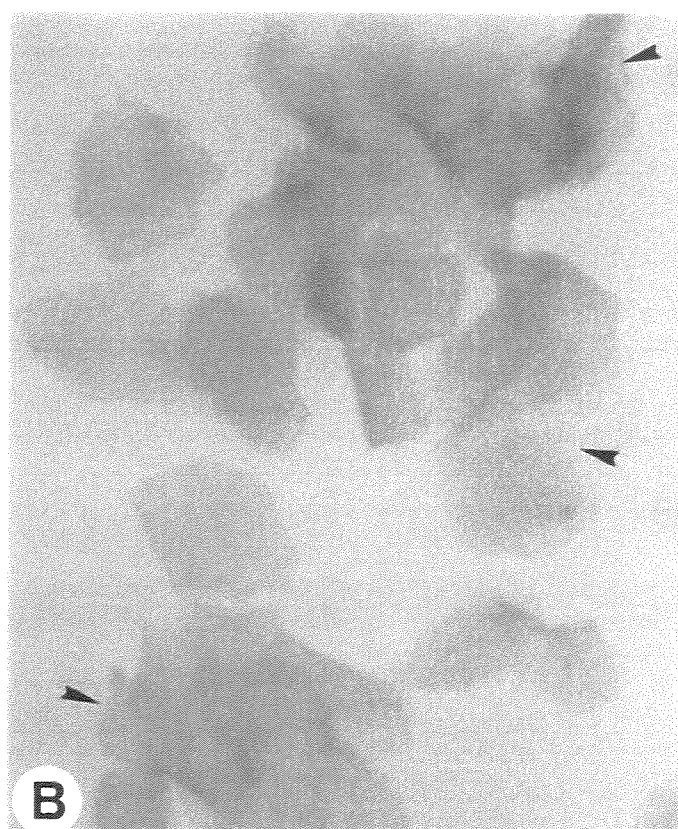
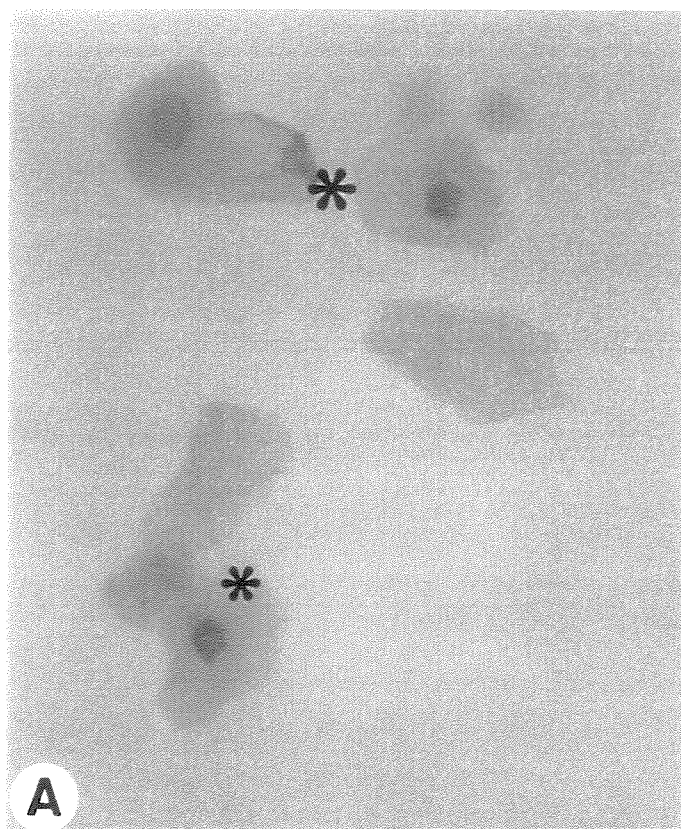


Fig. 2. Fotomicrografia em esfregaços vaginais, corados com HE, das diferentes fases do ciclo estral dos ratos UChA, avaliadas durante 20 dias consecutivos.

- A) Proestro.** Predomínio de células epiteliais (asterisco). 873X.
- B) Estro.** Células queratinizadas (cabeça de seta). 900X.
- C) Metaestro.** Células queratinizadas e leucócitos (estrela). 833X.
- D) Diestro.** Leucócitos (estrela) e células epiteliais. 1000X.

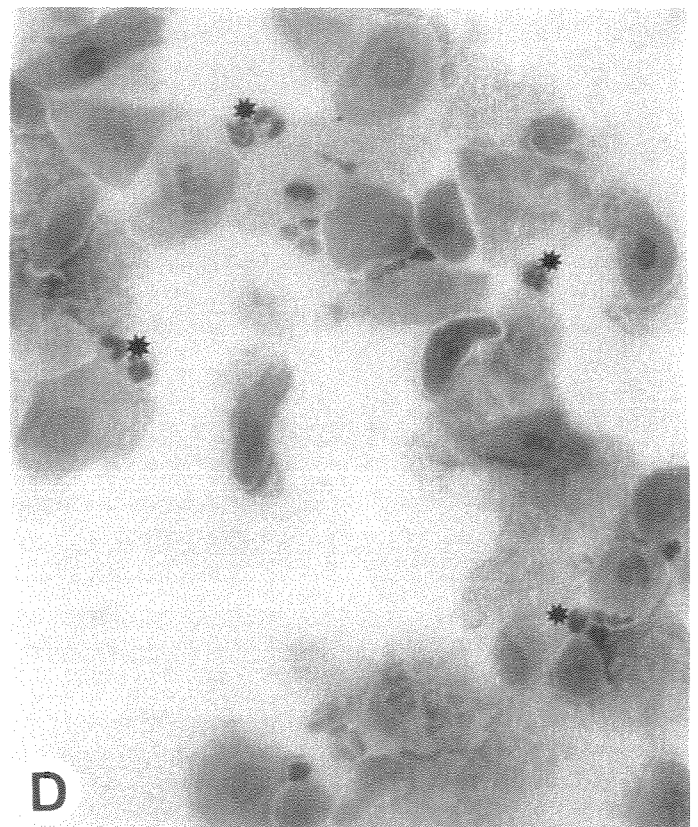
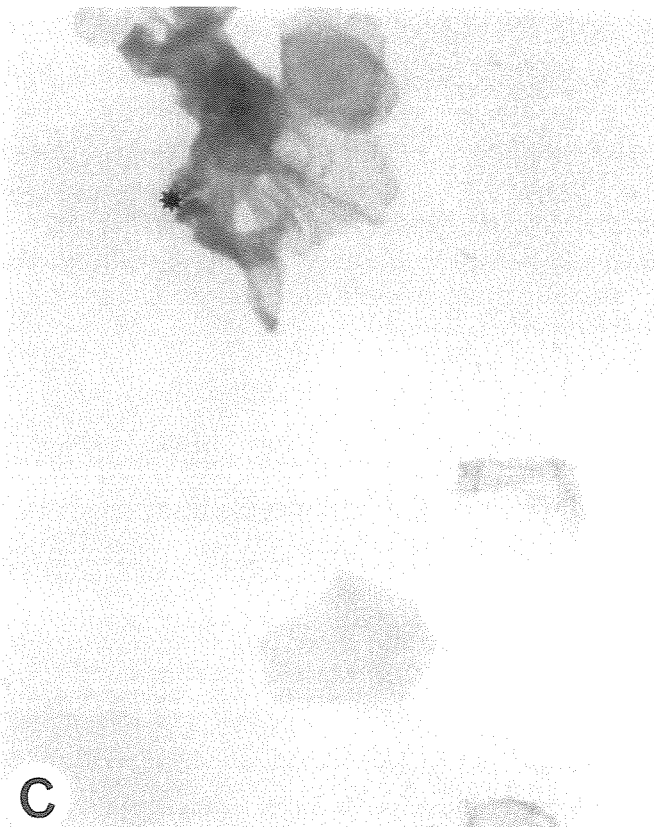
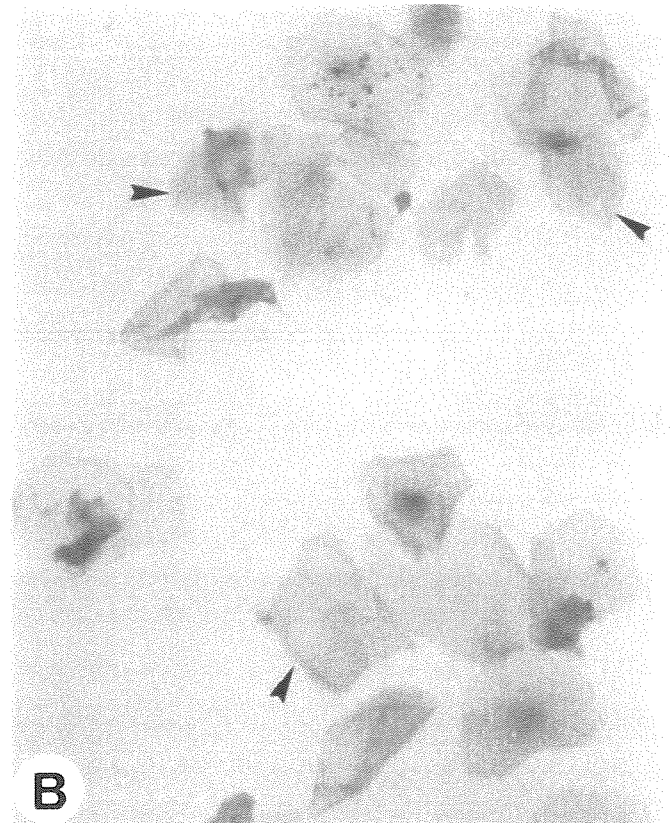
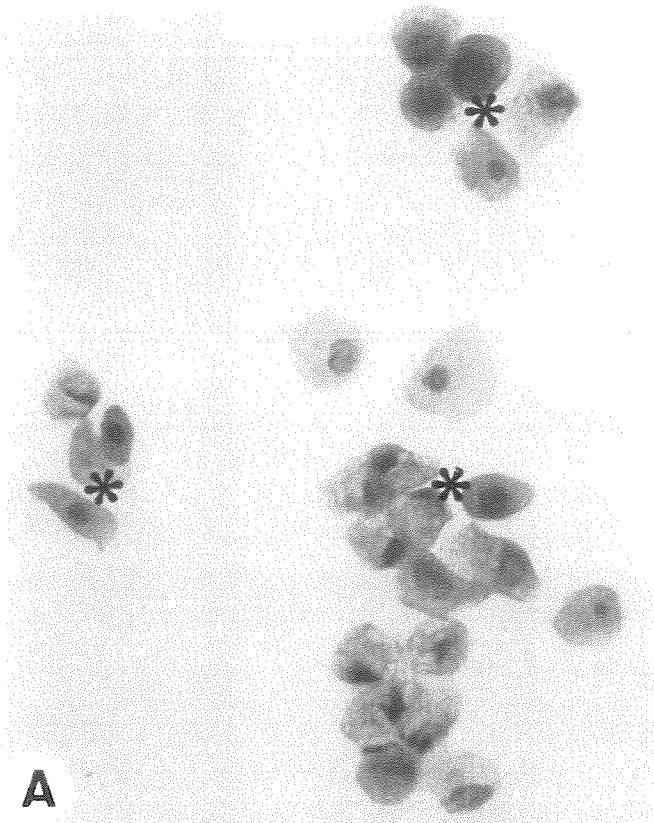
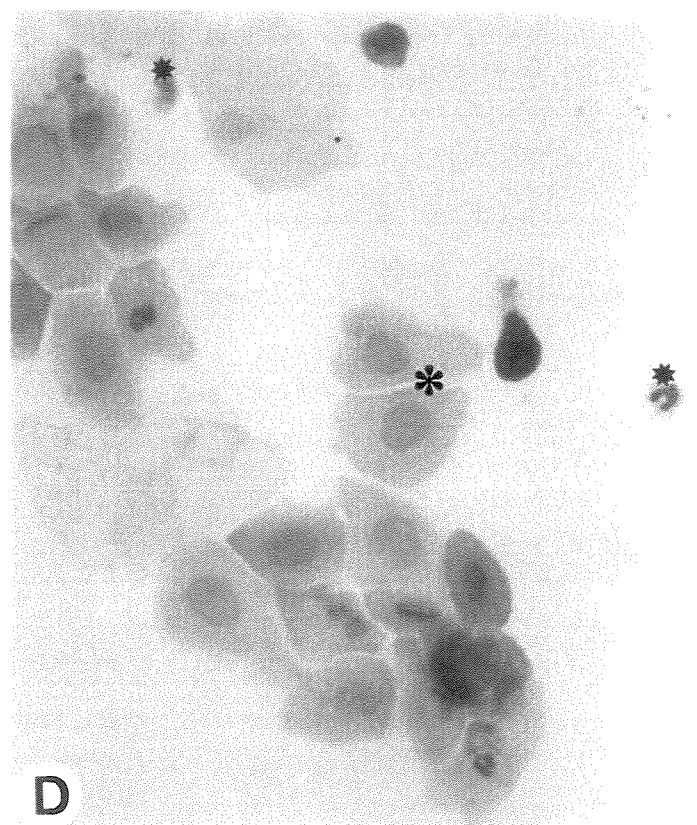
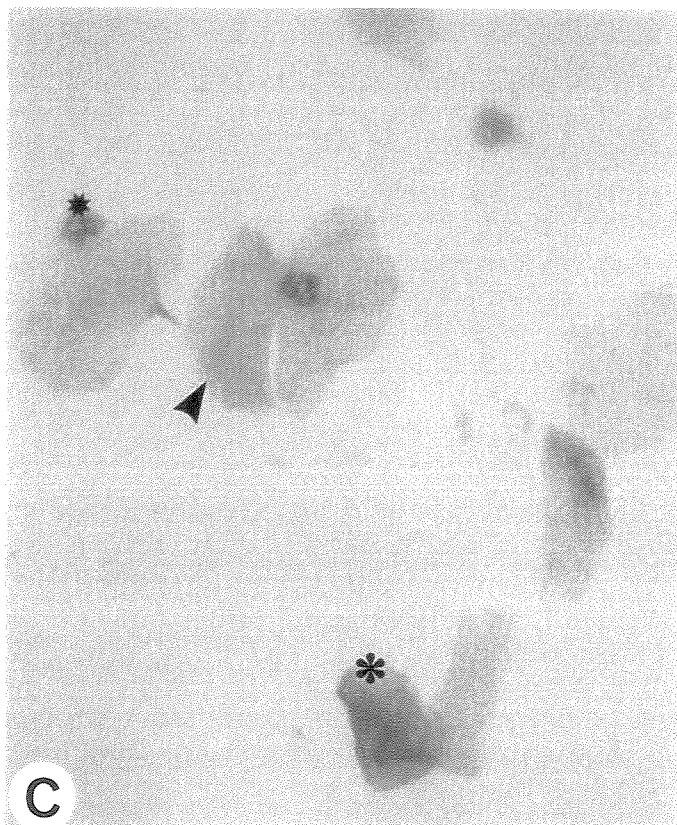
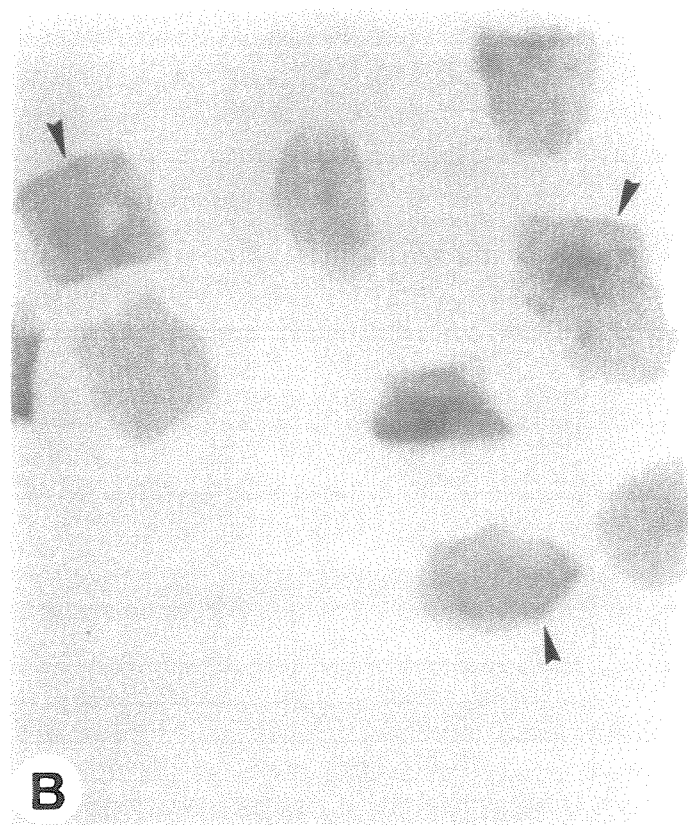
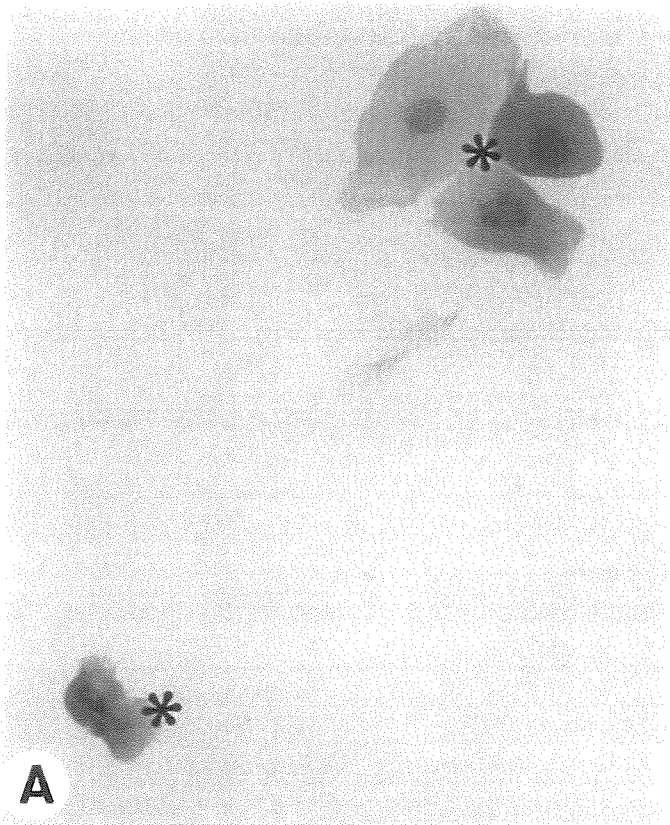


Fig. 3. Fotomicrografia em esfregaços vaginais, corados com HE, das diferentes fases do ciclo estral dos ratos UChB, avaliadas durante 20 dias consecutivos.

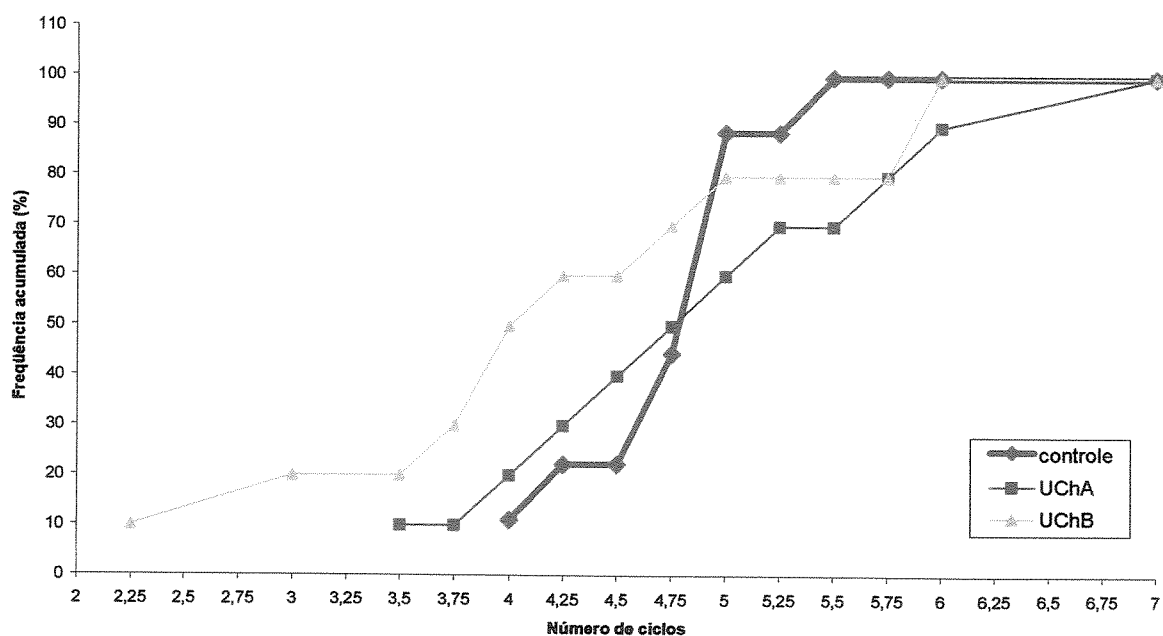
- A) Proestro.** Predomínio de células epiteliais (asterisco). 920X.
- B) Estro.** Células queratinizadas (cabeça de seta). 818X.
- C) Metaestro.** Células queratinizadas (cabeça de seta), leucócitos (estrela) e células epiteliais (asterisco). 733X.
- D) Diestro.** Leucócitos (estrela) e células epiteliais (asterisco). 850X.



Tab. 1. Medidas descritivas do número de ciclos e resultado do teste de comparação de grupos.

Medida descritiva	Grupo			Resultado do teste estatístico
	Controle	UChA	UChB	
Nº de animais	9	10	10	
Valor mínimo	4,00	3,50	2,25	
1º. Quartil	4,00	4,25	3,50	
Mediana	5,00	5,00	4,25	
3º. Quartil	5,00	5,75	5,25	2,18(P>0,05)
Valor máximo	5,50	7,00	6,00	
Média	4,81	5,00	4,30	
Desvio Padrão	0,45	1,04	1,20	

20 dias = 480 horas			
	Média de ciclos	Tempo médio de um ciclo	Tempo médio da fase
C	4,81	99h47min32seg	24h3min20seg
UChA	5,00	96h00min00seg	24h0min0seg
UChB	4,30	111h37min41seg	27h3min20seg

Fig. 4. Gráfico da distribuição de freqüências dos ciclos segundo grupo de estudo.

Constatou-se abundância dos tipos celulares para as respectivas fases (Proestro, Estro, Metaestro, Diestro) no grupo controle comparado ao UChA e UChB. O número de ciclos, segundo grupo de estudo, não diferiu estatisticamente, embora o tempo de permanência em cada fase do ciclo tenha variado, indicando que a duração de uma mesma fase foi diferente de acordo com o grupo analisado. Os grupos UChA e UChB apresentaram coeficiente de variação maior, portanto maior variabilidade. Apesar dos animais dos grupos UChA e UChB demonstrarem ciclo estral irregular (estros prolongados), a morfologia dos tipos celulares não diferiu do grupo controle.

II: Microscopia de Luz (MLuz)

O epitélio da tuba uterina do rato é formado por dois tipos de células: secretora (CS) e ciliada (CC).

A região intramural (In) dos ratos do grupo controle apresentou-se com dobras longitudinais curtas e retilíneas em direção à luz (**Fig. 5D**). O epitélio apresentou homogeneidade em altura (**Fig. 5A**). Os núcleos apresentaram-se com nucléolos evidentes (**Fig. 5G**) e as colorações HE (**Fig. 5A**) e AT (**Fig. 5D**) apresentaram-se homogêneas. A reação ao PAS apresentou-se tênue na extremidade apical (nos microvilos) das CS e discreta no citoplasma (**Fig. 5G**). A reação à FA foi intensa na porção supra-nuclear (formando uma faixa), mas não atingindo as extremidades apicais das células (**Fig. 5J**).

A região In dos ratos UChA apresentou dobras epiteliais disformes em direção à luz e coloração mais intensa comparada ao grupo controle (AT)(**Fig. 5E**). O epitélio apresentou heterogeneidade em altura devido à formação de lacunas em seu interior (**Fig. 5E**). Também foram observados vacúolos distribuídos pelo citoplasma das células (**Fig. 5B**). De maneira geral, os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao controle (**Fig. 5B,E e H**). A reação ao PAS foi similar ao controle para a mesma região (**Fig. 5H**). O grupo UChA apresentou, em criomicrotomia, o aspecto de retração do tecido e a reação à FA na porção supra-nuclear apresentou-se não tão delimitada comparada ao controle, porém restrita ao epitélio (**Fig. 5K**).

A região In dos ratos UChB apresentou dobras epiteliais muito disformes e coloração heterogênea (resposta diferente do epitélio ao HE) (**Fig. 5C**). O epitélio

apresentou-se heterogêneo em altura devido às lacunas maiores e em maior número (Fig. 5C e F). Os núcleos apresentaram-se mais condensados (Fig. 5C,F e I), comparados ao controle, e alterados (Fig. 5C). Em AT (Fig. 5F), o epitélio apresentou aspecto diafanizado (coloração mais fraca). A reação ao PAS apresentou-se acentuada na extremidade apical das CS comparada aos grupos UChA e controle (Fig. 5I). A reação à FA desde a porção supra-nuclear até a extremidade apical foi muito intensa, assim como no tecido conjuntivo subjacente e na camada muscular (Fig. 5L).

A região do istmo (I) dos ratos do grupo controle apresentou dobras longitudinais salientes em direção à luz (Fig. 6D). O epitélio apresentou heterogeneidade em altura: CS altas no ápice das dobras e CC baixas na base das criptas (Fig. 6A). Os núcleos apresentaram-se com nucléolos evidentes e as colorações HE (Fig. 6A) e AT (Fig. 6D) apresentaram-se homogêneas. A reação ao PAS apresentou-se acentuada na porção apical, com destaque aos microvilos, comparada à região In do mesmo grupo (Fig. 6G). A reação à FA foi similar à região In do controle (Fig. 6J).

A região do I dos ratos UChA apresentou heterogeneidade em altura (Fig. 6B), sendo que as CC apresentaram-se mais baixas comparadas ao controle. O epitélio apresentou lacunas em seu interior (Fig. 6E). Os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao controle e a coloração HE (Fig. 6B) apresentou-se heterogênea. A reação ao PAS foi mais extensa (desde a porção supra-nuclear até a extremidade apical, com destaque aos longos microvilos) e intensa comparada à região do I do controle (Fig. 6H). O tecido apresentou aspecto de retração e a reação à FA na porção supra-nuclear apresentou-se mais difusa comparada ao controle e restrita ao epitélio (Fig. 6k).

A região do I dos ratos UChB apresentou heterogeneidade em altura (Fig. 6F): CC baixas como as do grupo UChA. lacunas no interior do epitélio e vacúolos distribuídos por toda a célula (Fig. 6C). Os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao controle e as colorações HE (Fig. 6C) e AT (Fig. 6F) apresentaram-se heterogêneas. A reação ao PAS foi mais intensa e extensa (atingiu uma área maior) comparada à região do I do grupo UChA (Fig. 6I). A reação à FA na porção supra-nuclear foi mais intensa

comparada ao grupo UChA e estendeu-se ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular (**Fig. 6L**).

A região da ampola (A) dos ratos do grupo controle apresentou dobras longitudinais longas projetadas na luz, limitando-a (**Fig. 7D**). O epitélio apresentou homogeneidade em altura a partir da lâmina própria (**Fig. 7A**). Os núcleos apresentaram-se com nucléolos evidentes e as colorações HE (**Fig. 7A**) e AT (**Fig. 7D**) apresentaram-se homogêneas. A reação ao PAS apresentou-se tênue na extremidade apical das células (CC e CS) e acentuada no citoplasma, principalmente na porção supra-nuclear, comparada à região In do mesmo grupo (**Fig. 7G**). A reação à FA foi estritamente supra-nuclear e pontual (**Fig. 7J**).

A região da A dos ratos UChA apresentou menor quantidade de dobras em direção à luz, comparada ao controle, amplificando-a (**Fig. 7B**). O epitélio apresentou lacunas e vacúolos (**Fig. 7E**). Os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao controle e as colorações HE (**Fig. 7B**) e AT (**Fig. 7E**) apresentaram-se heterogêneas. Também foram observados na luz do epitélio vários oócitos (**Fig. 7B**). A reação ao PAS apresentou-se tênue na extremidade apical e discreta no citoplasma das células (**Fig. 7H**). O tecido apresentou aspecto de retração e a reação à FA na porção supra-nuclear foi mais homogênea (menos pontual) comparada ao controle para a mesma região (**Fig. 7K**).

A região da A dos ratos UChB apresentou heterogeneidade em altura do epitélio devido às lacunas maiores e em maior número comparadas ao grupo UChA (**Fig. 7F**). Algumas lacunas apresentaram conteúdo em seu interior (**Fig. 7F**). Também foram observados vacúolos distribuídos pelo citoplasma das células (**Fig. 7C**). Os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao controle e as colorações HE (**Fig. 7C**) e AT (**Fig. 7F**) apresentaram-se heterogêneas, sendo que em AT, o epitélio apresentou aspecto diafanizado (**Fig. 7F**). Em relação ao grupo UChA, observou-se aumento no número de oócitos na luz. A reação ao PAS apresentou-se intensa na extremidade apical, comparada aos grupos UChA e controle, e discreta no citoplasma das células (**Fig. 7I**). O tecido apresentou aspecto de retração e a reação à FA na porção supra-nuclear foi mais intensa comparada aos grupos UChA e controle e extensiva em pontos do tecido conjuntivo subjacente e camada muscular (**Fig. 7L**).

Fig. 5. Fotomicrografias da região In dos ratos controle, UChA e UChB. Barra=21µm.

- A)** In dos ratos controle: altura homogênea do epitélio (barra). Luz do epitélio (L). HE.
- B)** In dos ratos UChA: altura heterogênea do epitélio (barra) e vacúolos (cabeça de seta). Luz do epitélio (L). HE.
- C)** In dos ratos UChB: altura (barra) e coloração heterogêneas do epitélio. Núcleos alterados (seta). Luz do epitélio (L). HE.
- D)** In dos ratos controle: dobras longitudinais (asterisco) curtas e retilíneas em direção à luz (L). AT.
- E)** In dos ratos UChA: dobras epiteliais disformes em direção à luz (L) e lacunas (seta) no interior do epitélio. AT.
- F)** In dos ratos UChB: aspecto diafanizado do epitélio e lacunas (seta) no epitélio. Luz do epitélio (L). AT.
- G)** In dos ratos controle: reação tênue na extremidade apical das CS (seta delgada) e nucléolos evidentes (seta espessa). Luz do epitélio (L). PAS.
- H)** In dos ratos UChA: reação tênue na extremidade apical das CS (seta delgada) e vacúolos (cabeça de seta) na porção infra-nuclear. Luz do epitélio (L). PAS.
- I)** In dos ratos UChB: reação acentuada na extremidade apical das CS (seta delgada). Luz do epitélio (L). PAS.
- J)** In dos ratos controle: reação intensa na porção supra-nuclear (seta) formando uma faixa. Luz do epitélio (L). FA.
- K)** In dos ratos UChA: aspecto de retração do tecido e reação não tão delimitada (seta) na porção supra-nuclear comparada ao controle. Luz do epitélio (L). FA.
- L)** In dos ratos UChB: retração do tecido e reação muito intensa desde a porção supra-nuclear até a extremidade apical (seta) e, extensiva ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular (asterisco). Luz do epitélio (L). FA.

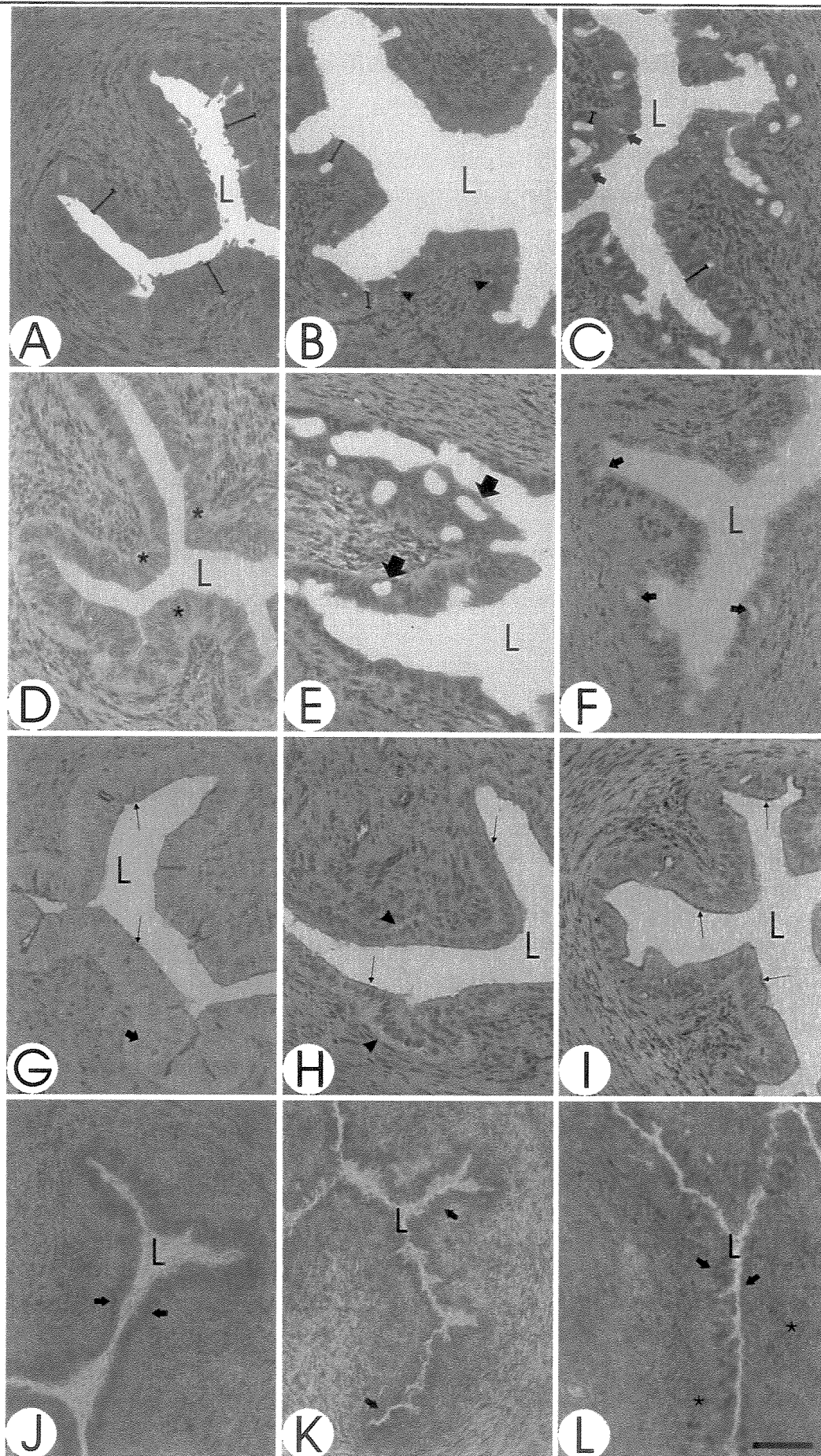


Fig. 6. Fotomicrografias da região de I dos ratos controle, UChA e UChB. Barra=21µm.

- A) I dos ratos controle: altura heterogênea do epitélio (barra). Luz do epitélio (L). HE.
- B) I dos ratos UChA: altura heterogênea do epitélio (barra) com CC (na base das criptas) mais baixas comparadas ao controle. Luz do epitélio (L). HE.
- C) I dos ratos UChB: coloração heterogênea do epitélio, lacunas (seta) e vacúolos (cabeça de seta). Luz do epitélio (L). HE.
- D) I dos ratos controle: dobras longitudinais (asterisco) salientes em direção à luz (L). AT.
- E) I dos ratos UChA: lacunas (seta) no interior do epitélio. Luz do epitélio (L). AT.
- F) I dos ratos UChB: aspecto diafanizado e altura heterogênea do epitélio. Luz do epitélio (L). AT.
- G) I dos ratos controle: reação acentuada na porção apical (seta delgada) com destaque aos microvilos. Luz do epitélio (L). PAS.
- H) I dos ratos UChA: reação mais extensa e intensa (seta delgada) comparada ao controle. Luz do epitélio (L). PAS.
- I) I dos ratos UChB: reação mais intensa (seta delgada) comparada ao grupo UChA. Luz do epitélio (L). PAS.
- J) I dos ratos controle: reação intensa na porção supra-nuclear (seta). Luz do epitélio (L). FA.
- K) I dos ratos UChA: aspecto de retração do tecido e reação mais difusa (seta) na porção supra-nuclear comparada ao controle. Luz do epitélio (L). FA.
- L) I dos ratos UChB: retração do tecido e reação mais intensa (seta) comparada ao grupo UChA e, extensiva ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular (asterisco). Luz do epitélio (L). FA.

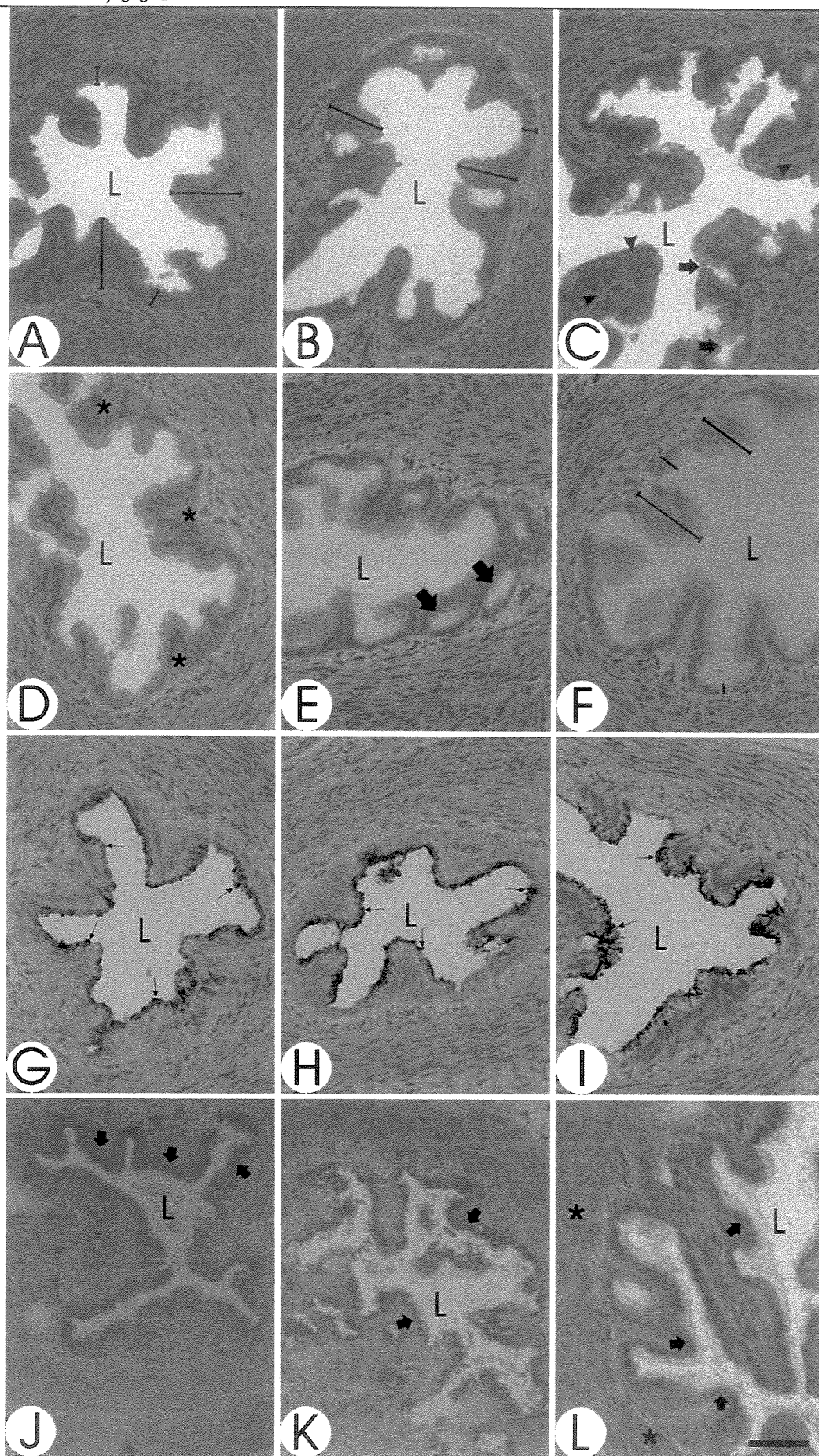
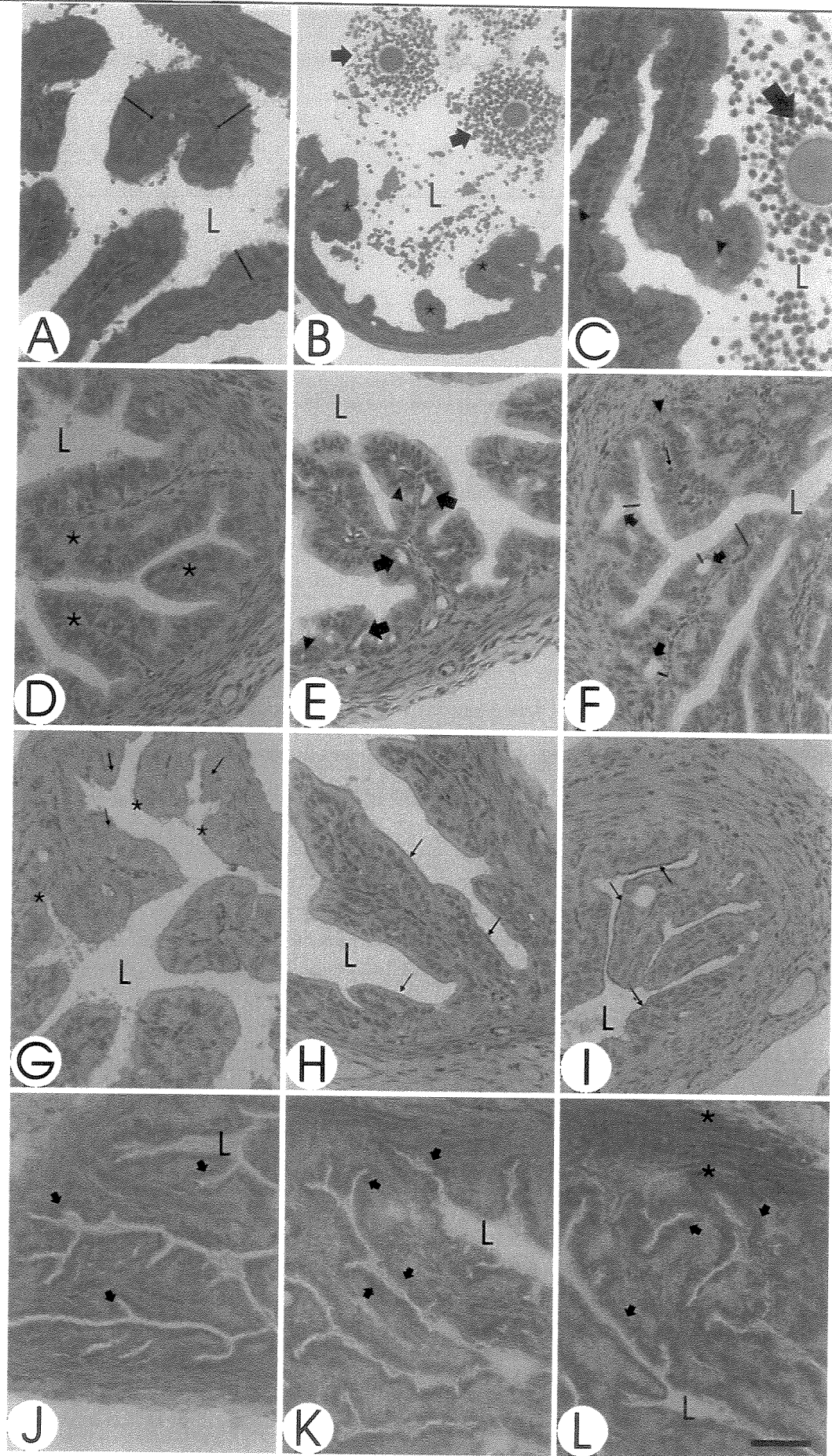


Fig. 7. Fotomicrografias da região da A dos ratos controle, UChA e UChB.

- A) A dos ratos controle: altura homogênea do epitélio (barra) a partir da lâmina própria. Luz do epitélio (L). HE. Barra=21µm.
- B) A dos ratos UChA: menor quantidade de dobras (asterisco) em direção à luz (L), comparada ao controle, e presença de oócitos (seta). HE. Barra=10µm.
- C) A dos ratos UChB: coloração heterogênea do epitélio, vacúolos (cabeça de seta) e oócito (seta) na luz (L). HE. Barra=21µm.
- D) A dos ratos controle: dobras longitudinais (asterisco) longas projetadas na luz (L). AT. Barra=21µm.
- E) A dos ratos UChA: vacúolos (cabeça de seta) e lacunas (seta) no epitélio. Luz do epitélio (L). AT. Barra=21µm.
- F) A dos ratos UChB: aspecto diafanizado, lacunas com conteúdo (cabeça de seta) ou não (seta) em seu interior e altura heterogênea do epitélio (barra). Luz do epitélio (L). AT. Barra=21µm.
- G) A dos ratos controle: reação tênue na extremidade apical (asterisco) e acentuada no citoplasma (seta delgada). Luz do epitélio (L). PAS. Barra=21µm.
- H) A dos ratos UChA: reação tênue na extremidade apical (seta delgada) e discreta no citoplasma das células. Luz do epitélio (L). PAS. Barra=21µm.
- I) A dos ratos UChB: reação intensa na extremidade apical (seta delgada) comparada aos grupos controle e UChA. Luz do epitélio (L). PAS. Barra=21µm.
- J) A dos ratos controle: reação supra-nuclear e pontual (seta). Luz do epitélio (L). FA. Barra=21µm.
- K) A dos ratos UChA: aspecto de retração do tecido e reação mais homogênea (seta) comparada ao controle. Luz do epitélio (L). FA. Barra=21µm.
- L) A dos ratos UChB: retração do tecido e reação mais intensa (seta) comparada aos grupos controle e UChA e, extensiva ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular (asterisco). Luz do epitélio (L). FA. Barra=21µm.



III: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O epitélio da mucosa da porção In do grupo controle apresentou CS com grande quantidade de microvilos curtos (Fig. 8A), núcleo com formato regular alongado (Fig. 8B), mitocôndrias e grânulos de secreção pequenos e elétron-densos (Fig. 8A). CC raramente foram observadas nesse segmento.

O epitélio da região In dos ratos UChA apresentou células contendo microvilos delgados e escassos em sua superfície (Fig. 8C). O citoplasma das CS apresentou inúmeros vacúolos e cisternas (como a do retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi) dilatadas (Fig. 8D), dando ao epitélio o aspecto de vacuolização e perda de identidade, comparado ao grupo controle. Os núcleos possuíam forma irregular, com inúmeras lobações (Fig. 8C) e, devido ao plano de corte, pareciam apresentar conteúdo em seu interior (Fig. 8E). Gotas lipídicas foram observadas entre as chanfraduras do núcleo (Fig. 8F). Mitocôndrias preservadas foram observadas pelo citoplasma de toda a célula (Fig. 8D,E). Grânulos de secreção foram observados com pouca frequência.

A região In dos ratos UChB apresentou microvilos delgados elétron-densos (Fig. 9A). Inúmeros vacúolos gigantes foram observados no citoplasma desde a região basal até a apical (Fig. 9B,C), conferindo ao epitélio o aspecto de vacuolização mais intenso, comparado aos ratos UChA, levando à perda da identidade. Os núcleos possuíam forma irregular, com lobações e conteúdo diferente ao nuclear em seu interior (Fig. 9D). Gotas lipídicas maiores que as do grupo UChA foram observadas (Fig. 9C,D). Mitocôndrias edemaciadas e pouco preservadas foram observadas pelo citoplasma de toda a célula (Fig. 9A). Grânulos de secreção foram observados com pouca frequência.

O epitélio da mucosa do istmo I do grupo controle apresentou predomínio de CS sobre CC. Os núcleos apresentaram-se alongados e com nucléolos evidentes (Fig. 10B). Inúmeros grânulos de secreção elétron-densos foram observados, principalmente, na porção apical das células (Fig. 10A). Observou-se variável quantidade de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Fig. 10A).

Na região do I dos ratos UChA, as CS estiveram recobertas por microvilos longos, os estereocílios, mais delgados e elétron-densos (Fig. 10C), comparados aos do grupo controle (Fig. 10A). Algumas células apresentaram núcleos com formato regular alongado

(Fig. 10D), enquanto outras exibiram formato irregular (Fig. 10E). Gotas lipídicas foram observadas na porção infra-nuclear das células (Fig. 10D). Também foram observados pelo citoplasma de toda a célula vacúolos e cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas (Fig. 10D,E). Mitocôndrias pouco preservadas estiveram presentes por todo o citoplasma da célula (Fig. 10D). Grânulos de secreção variando de moderadamente elétrondensos a elétrondensos foram observados na porção apical das CS (Fig. 10C) e vesículas contendo grânulos de secreção elétrondensos distribuídas pela porção supra-nuclear. Nesse segmento foram observadas poucas CC baixas, com cílios e corpúsculos basais escassos (Fig. 10F).

O epitélio da região do I dos ratos UChB apresentou CS altas no ápice das dobras e CC baixas na base das criptas (Fig. 11A). As CS apresentaram estereocílios elétrondensos (Fig. 11B). O núcleo apresentou-se com formato irregular e inúmeras chanfraduras (Fig. 11C). Corpos lamelares foram observados por toda a célula (Fig. 11D). Mitocôndrias pouco preservadas foram observadas no citoplasma das CS (Fig. 11E) e, principalmente, na porção apical das CC (Fig. 11F). Corpos multivesiculados e vesículas pequenas foram observados, principalmente, na porção apical da CS (Fig. 11D). Também foram observados grânulos de secreção moderadamente elétrondensos (Fig. 12A) e vesículas maiores contendo grânulos de secreção elétrondensos (Fig. 11E). Alguns grânulos de secreção moderadamente elétrondensos e elétrondensos apresentaram elétrondensidade alterada e estiveram distribuídos pela porção apical das CS (Fig. 12B). As cisternas do retículo endoplasmático rugoso e do aparelho de Golgi apresentaram-se dilatadas (Fig. 11E). Os cílios das CC apresentaram-se escassos e com distribuição irregular (Fig. 11F).

O epitélio da mucosa da A do grupo controle apresentou CS densamente preenchidas por microvilos delgados (Fig. 12C) e pequenos grânulos de secreção elétrondensos localizados, preferencialmente, na porção apical (Fig. 12D). As CC apresentaram concentrações de mitocôndrias em sua porção apical. Os núcleos das células ciliadas não diferiram daqueles das secretoras, apresentando-se alongados e com nucléolos evidentes.

O epitélio da região da A dos ratos UChA apresentou CS e CC. Os microvilos das células secretoras apresentaram-se mais elétrondensos (Fig. 12E,F) do que os do grupo controle. Em algumas porções apresentaram-se curtos e escassos e, em outras, densamente

agrupados e “colabados” (Fig. 12E,F). Os núcleos apresentaram-se com formato regular alongado, embora chanfraduras pudessem ser observadas (Fig. 13A,B). Vacúolos distribuídos por toda a célula e cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas (Fig. 13A,B), além de gotas lipídicas localizadas principalmente na porção infra-nuclear (Fig. 13B). Observou-se também, grau de elétron-densidade variável entre as CS (Fig. 13A). Alguns grânulos de secreção (moderadamente elétron-densos e elétron-densos) foram observados na porção apical das células (Fig. 12E). Tanto as CS quanto as CC apresentaram mitocôndrias não preservadas.

A região da A dos ratos UChB apresentou CS com microvilos delgados e CC intercaladas (Fig. 13C). Os núcleos apresentaram maior quantidade de chanfraduras comparados ao grupo UChA (Fig. 13C,D). Inúmeras mitocôndrias não preservadas e edemaciadas estiveram presentes (Fig. 13D,E). Maior quantidade de gotas lipídicas de tamanhos diferentes foram observadas tanto nas porções supra (Fig. 13E) e infra-nucleares (Fig. 13C), assim como inúmeros vacúolos e cisternas dilatadas (Fig. 13C,E) comparados ao grupo UChA. Variável diferença de elétron-densidade entre as CS, além da presença de corpos lamelares (Fig. 13E) e pequenos grânulos de secreção localizados na porção apical das células. Os núcleos das células ciliadas apresentaram formato regular alongado, mas inúmeras mitocôndrias não preservadas e edemaciadas estiveram presentes na porção apical (Fig. 13D,F).

Fig. 8. Eletromicrografia de transmissão da região In dos ratos controle e UChA.

- A)** In dos ratos controle: CS: microvilos (Mi) e grânulos de secreção elétron-densos (asterisco). 3740X.
- B)** In dos ratos controle: CS: núcleo regular alongado (N). 13200X.
- C)** In dos ratos UChA: CS: microvilos delgados (Mi), núcleo com lobações (N), vacúolos e cisternas do RER dilatadas (asterisco). 3300X.
- D)** In dos ratos UChA: CS: vacúolos e cisternas dilatadas (asterisco) e mitocôndrias preservadas (cabeça de seta). 4840X.
- E)** In dos ratos UChA: CS: núcleo com conteúdo em seu interior diferente ao nuclear (N) e mitocôndrias preservadas (cabeça de seta). 7700X.
- F)** In dos ratos UChA: CS: gotas lipídicas entre as chanfraduras do núcleo (asterisco). 13200X.

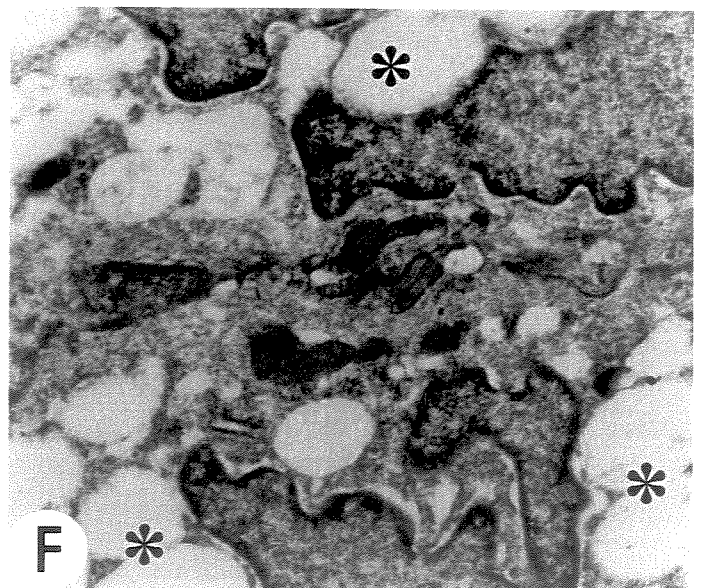
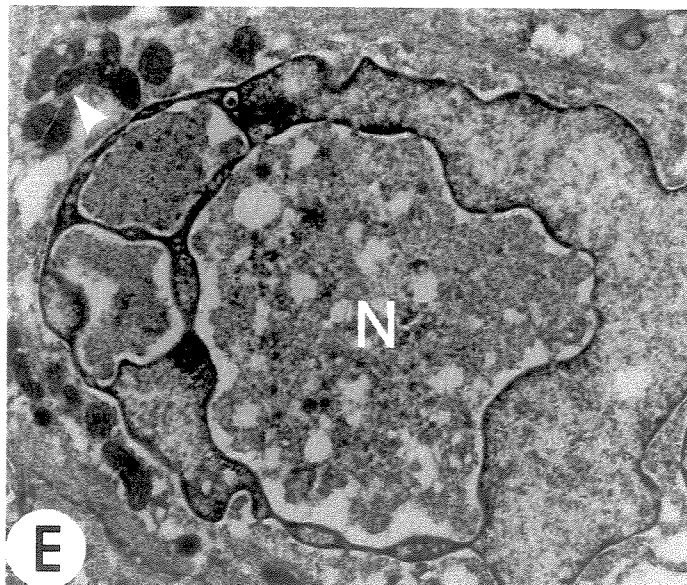
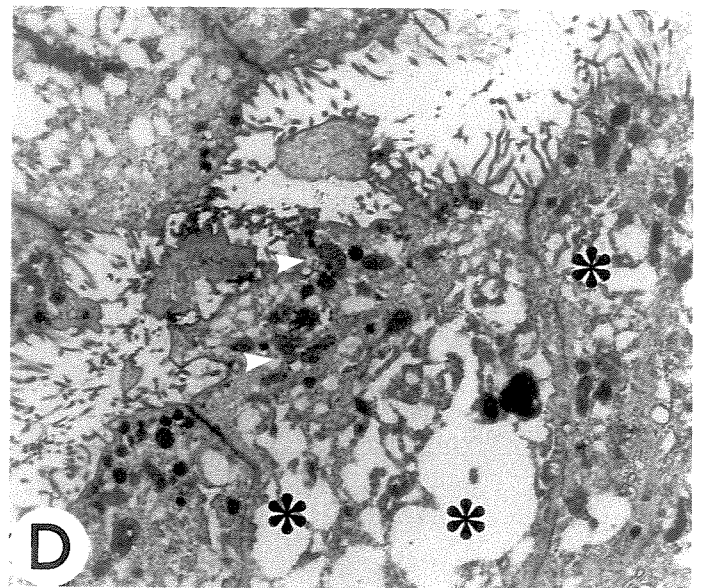
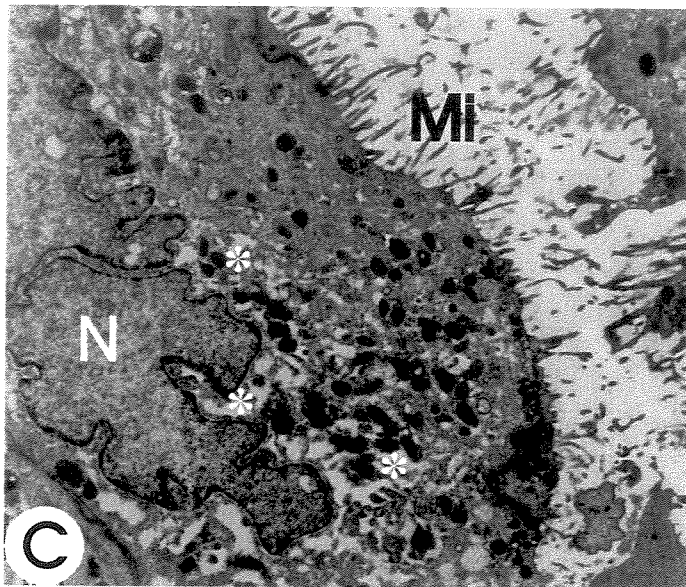
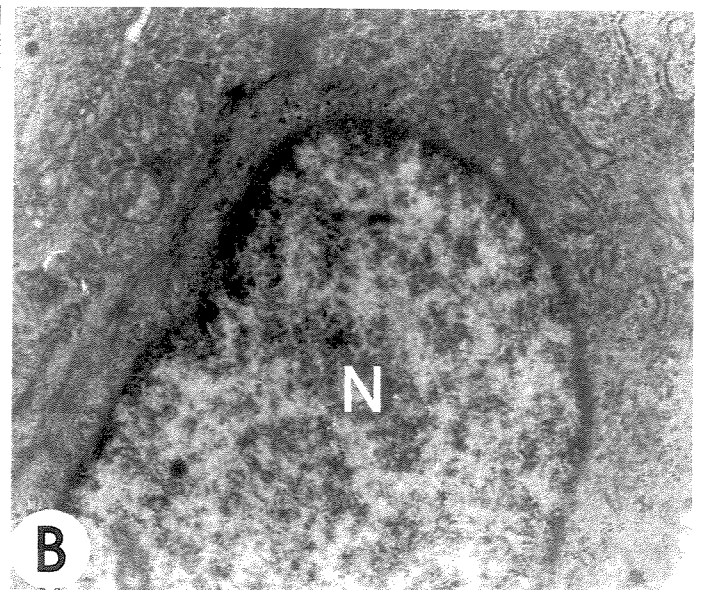
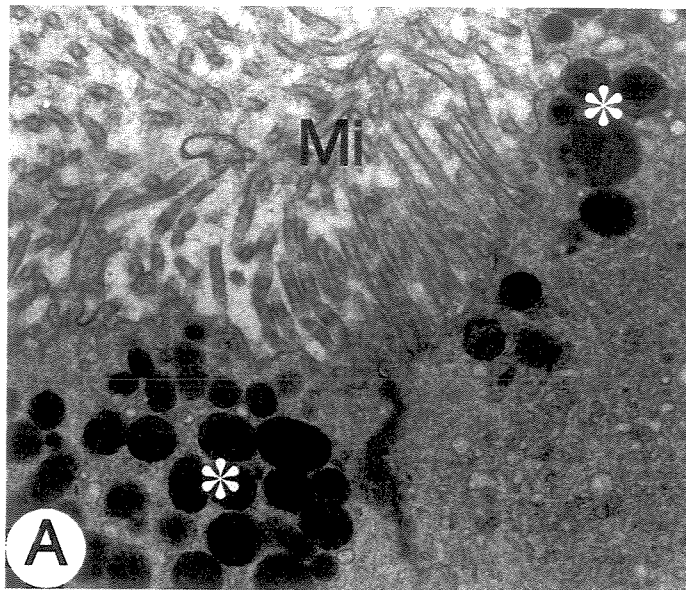


Fig. 9. Região In dos ratos UChB.

- A) CS: microvilos delgados elétron-densos (seta) e mitocôndrias edemaciadas (cabeça de seta). 17000X.
- B) CS: intensa vacuolização do citoplasma (asterisco). 9750X.
- C) CS: cisternas do RER dilatadas (asterisco) e grupo de gotas lipídicas (cabeça de seta). 17000X.
- D) CS: núcleo com conteúdo em seu interior diferente ao nuclear (N) e gota lipídica (seta). 13200X.

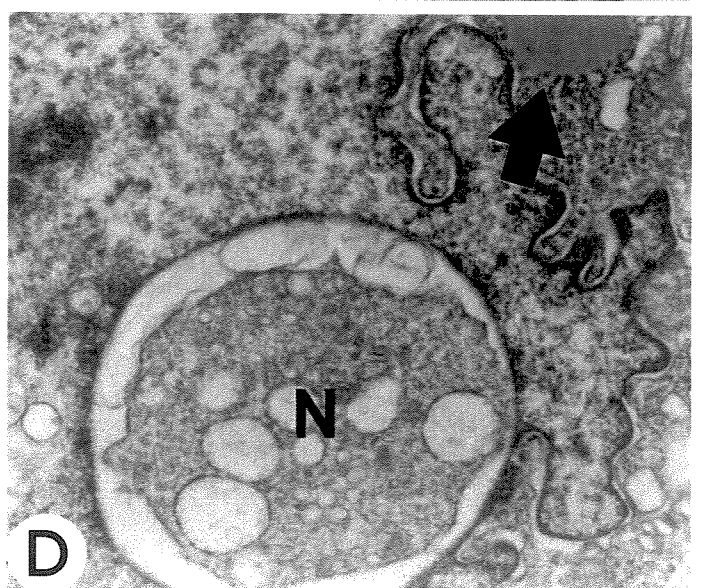
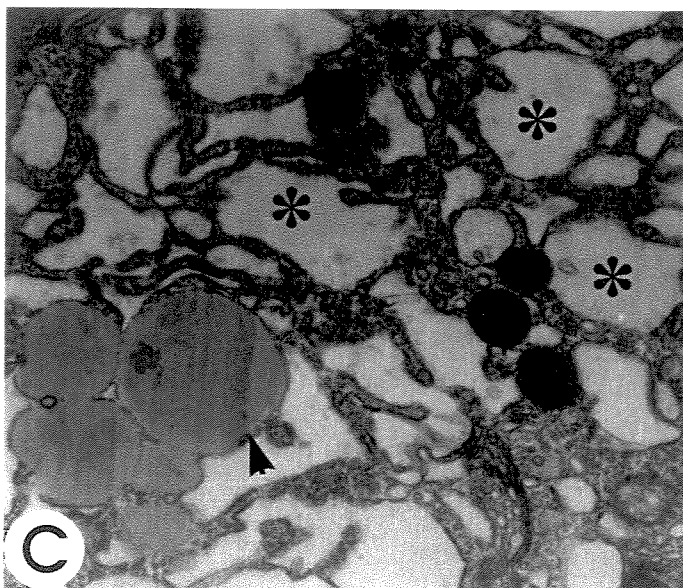
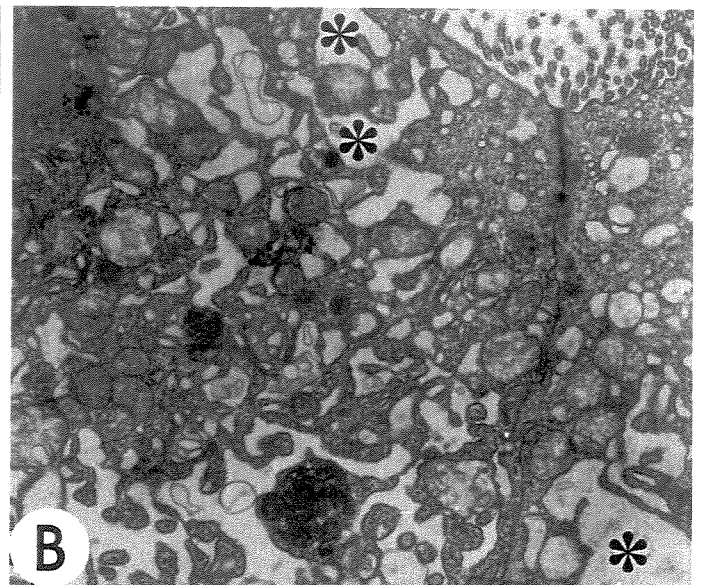
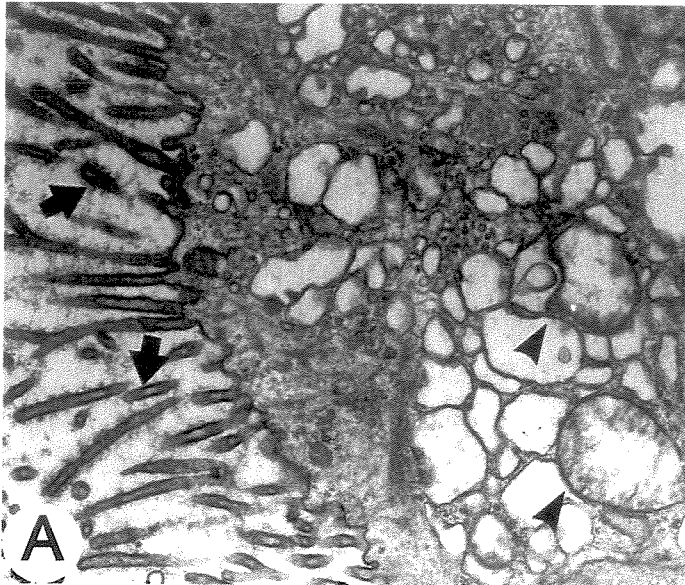


Fig. 10. Região de I dos ratos controle e UChA.

- A) I dos ratos controle: CS: grânulos de secreção elétron-densos (seta), retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta) e mitocôndrias (asterisco). 7700X.
- B) I dos ratos controle: CS: núcleo alongado com nucléolo evidente (seta). 13200X.
- C) I dos ratos UChA: CS: alta elétron-densidade dos microvilos (seta) e grânulos de secreção moderadamente elétron-densos (asterisco). 13200X.
- D) I dos ratos UChA: CS: porção infra-nuclear com núcleo regular alongado (N), cisternas do RER dilatadas (cabeça de seta), mitocôndrias pouco preservadas (seta) e gotas lipídicas (asterisco). 13200X.
- E) I dos ratos UChA: CC: núcleo irregular com chanfraduras (N) e cisternas dilatadas (seta). 13200X.
- F) I dos ratos UChA: CC: cílios (seta) e corpúsculos basais (cabeça de seta) escassos. 13200X.

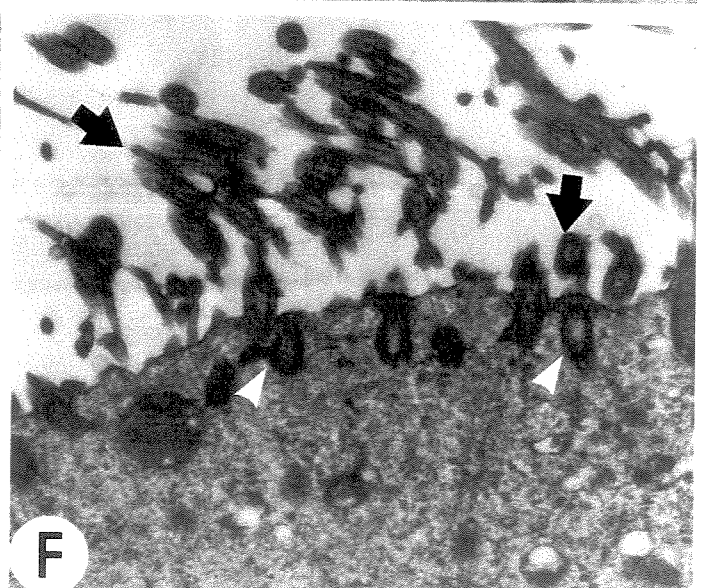
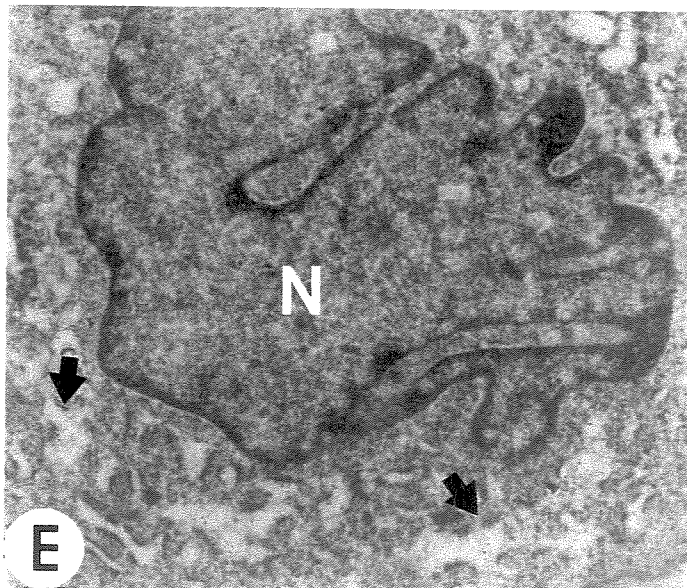
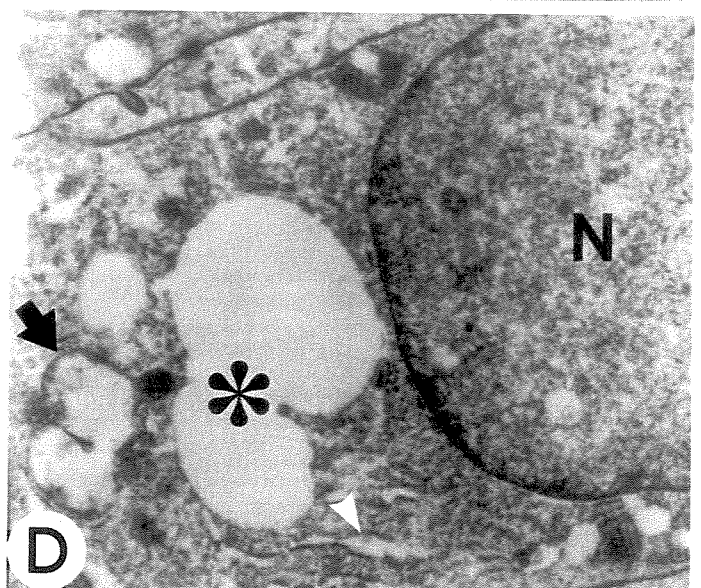
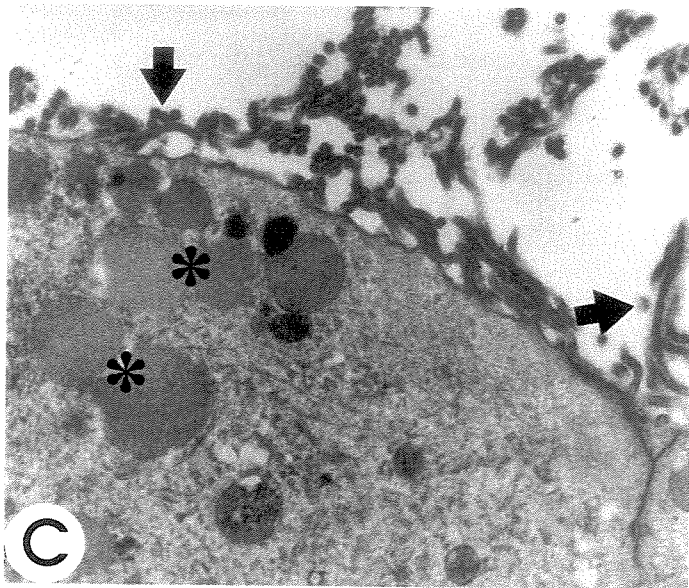
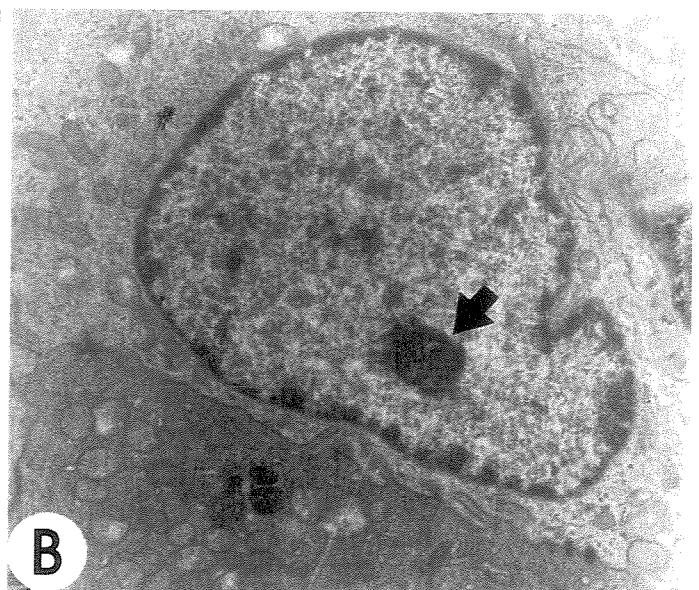
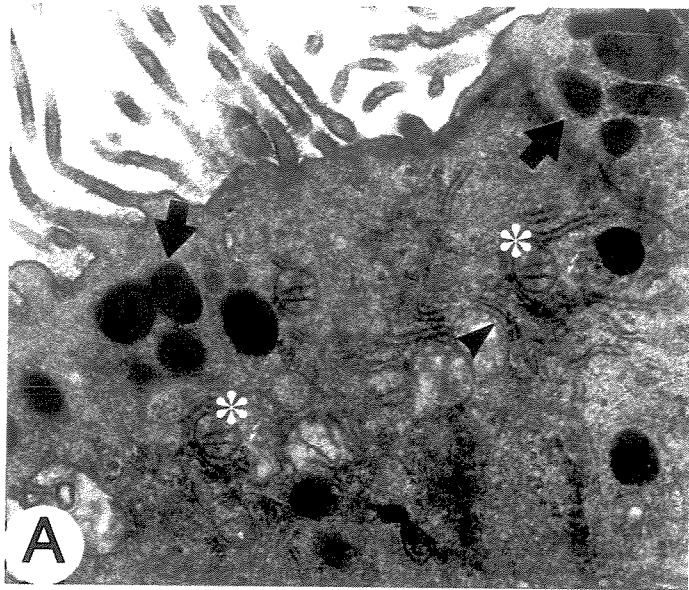


Fig. 11. Região de I dos ratos UChB.

- A) Altura heterogênea do epitélio: células secretoras (CS) altas e ciliadas (CC) baixas. 2450X.
- B) CS: estereocílios elétron-densos (seta). 23000X.
- C) CS: núcleo irregular com chanfraduras (asterisco). 13250X.
- D) CS: corpo lamelar (seta), corpos multivesiculados (asterisco) e vesículas pequenas (cabeça de seta). 13200X.
- E) CS: mitocôndrias pouco preservadas (seta), vesículas contendo grânulos elétron-densos (asterisco) e cisternas (do aparelho de Golgi) dilatadas (cabeça de seta). 13250X.
- F) CC: mitocôndrias pouco preservadas na porção apical de células ciliadas (cabeça de seta) e cílios escassos (seta). 7750X.

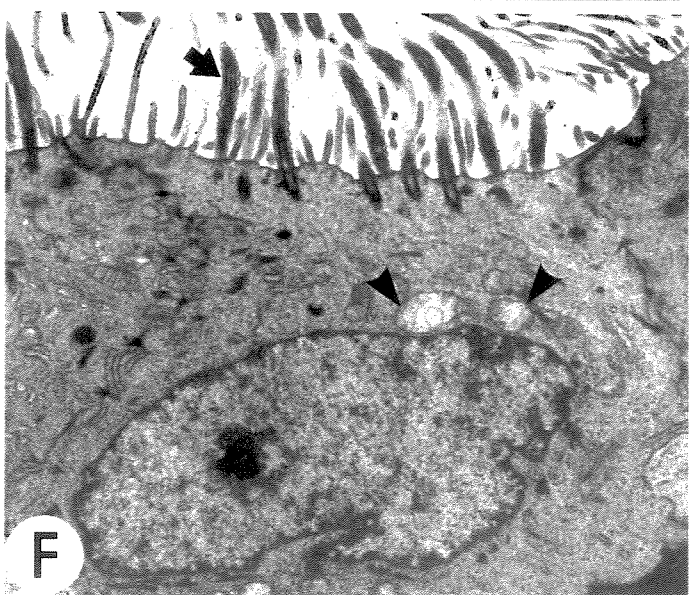
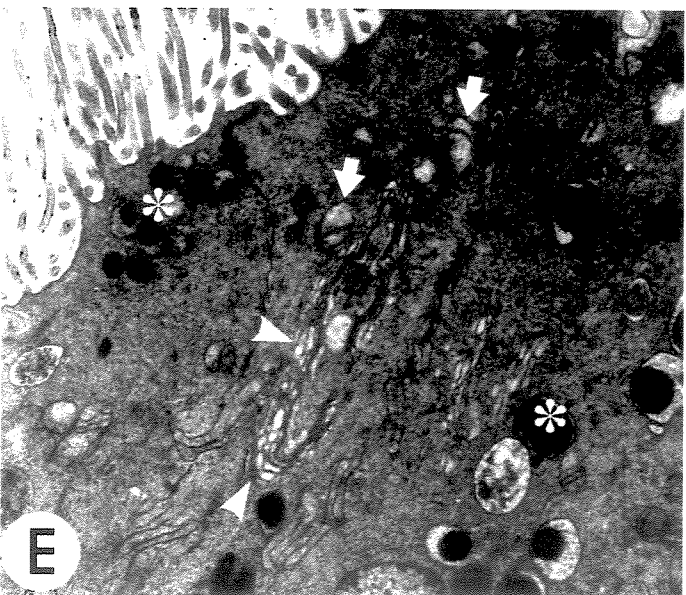
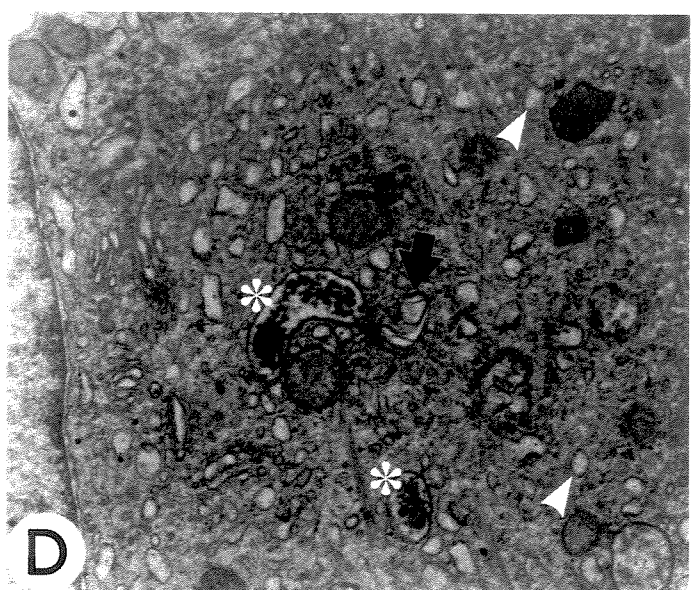
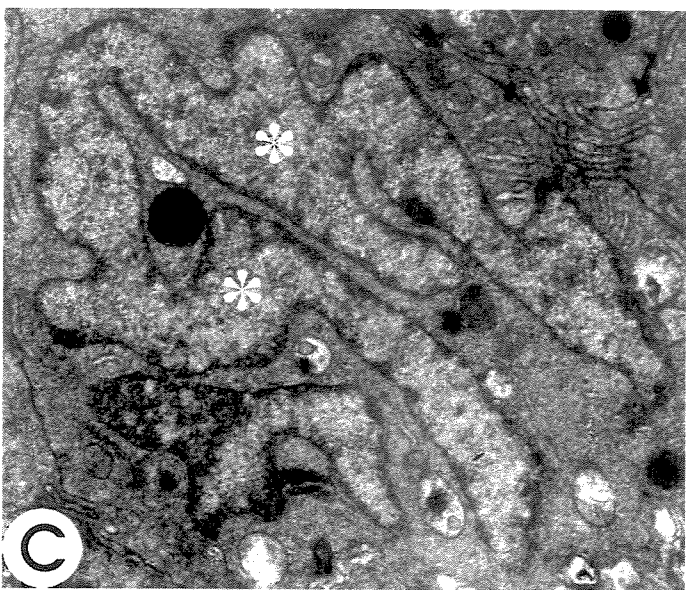
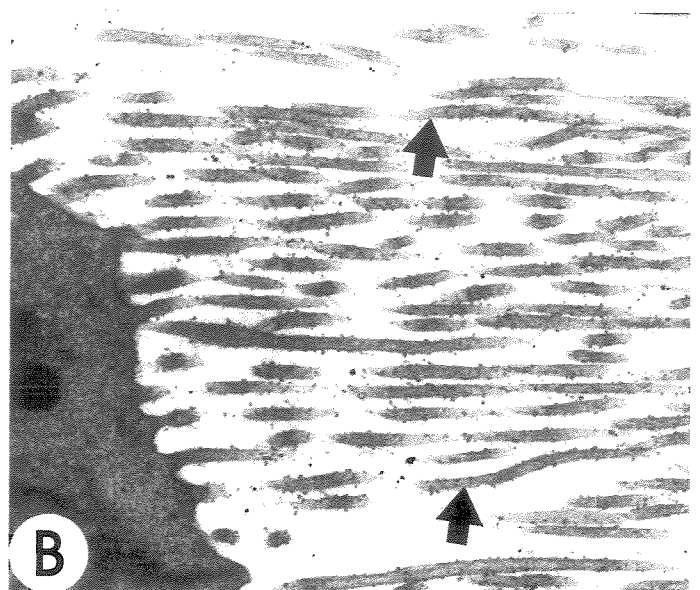
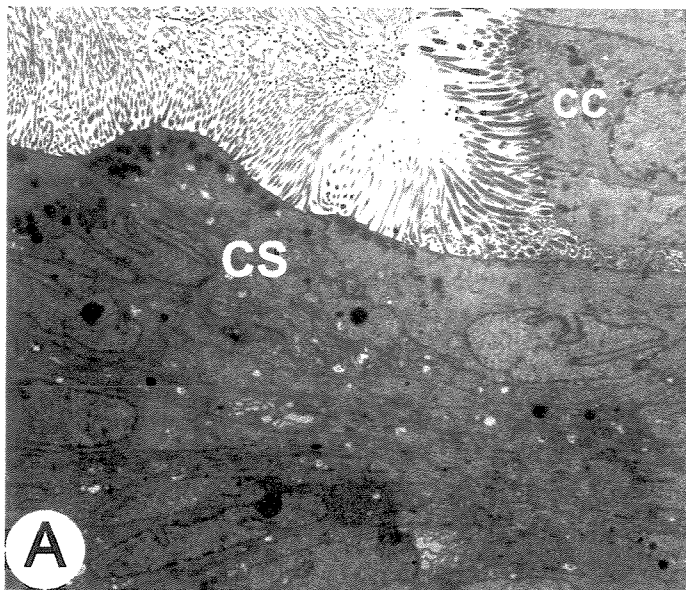


Fig. 12. Região de I do grupo UChB e região da A dos ratos controle e UChA.

- A) I dos ratos UChB: CS: grânulos de secreção moderadamente elétron-densos (seta). 9750X.
- B) I dos ratos UChB: CS: elétron-densidade alterada dos grânulos de secreção. 31500X.
- C) A dos ratos controle: CS: porção apical das células secretoras densamente preenchidas por microvilos delgados (Mi). 13250X.
- D) A dos ratos controle: CS: grânulos de secreção elétron-densos na porção apical. 13250X.
- E) A dos ratos UChA: CS: alta elétron-densidade dos microvilos (seta), grânulos de secreção moderadamente elétron-densos e elétron-densos (cabeça de seta). 7750X.
- F) A dos ratos UChA: CS: microvilos elétron-densos agrupados e “colabados” (asterisco). 13250X.

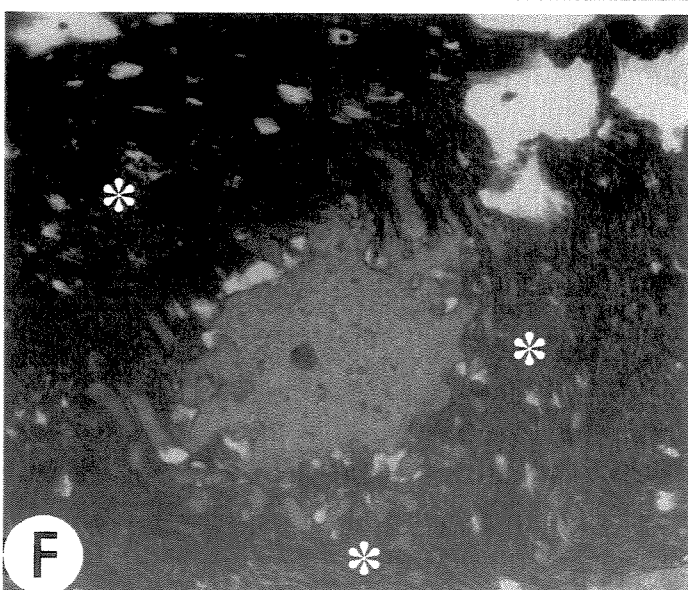
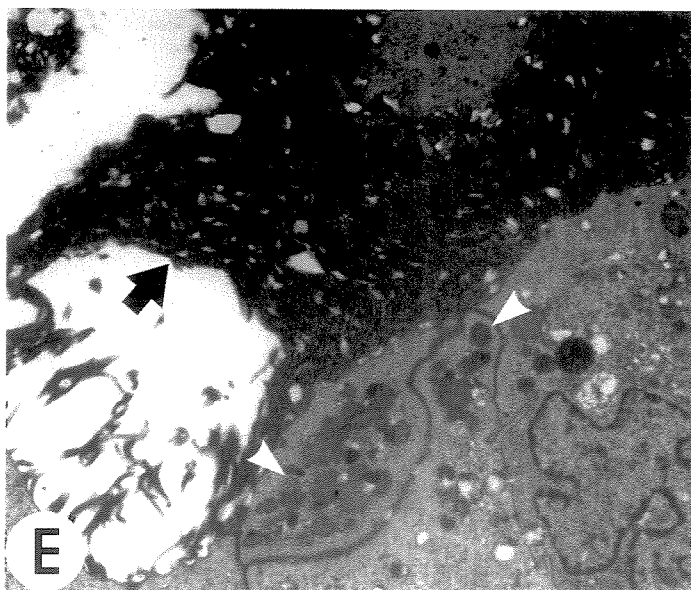
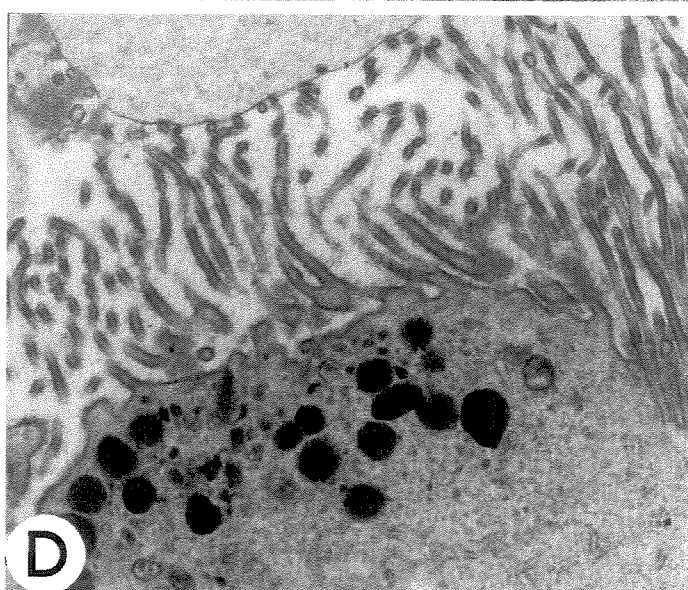
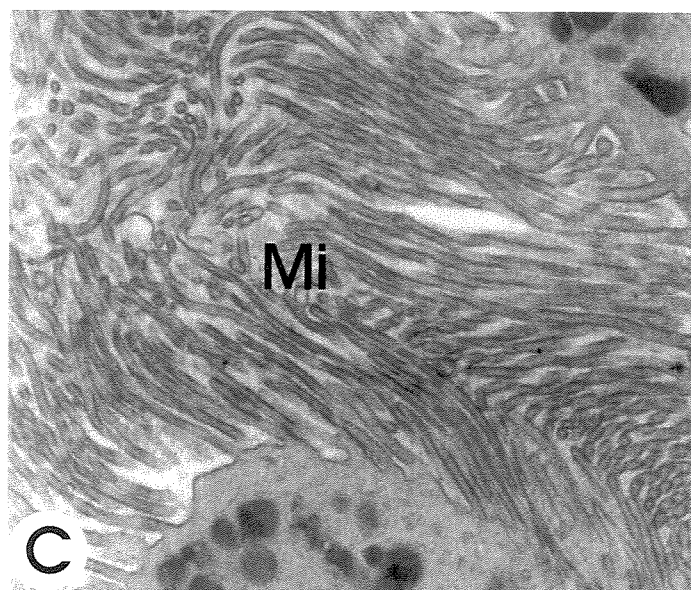
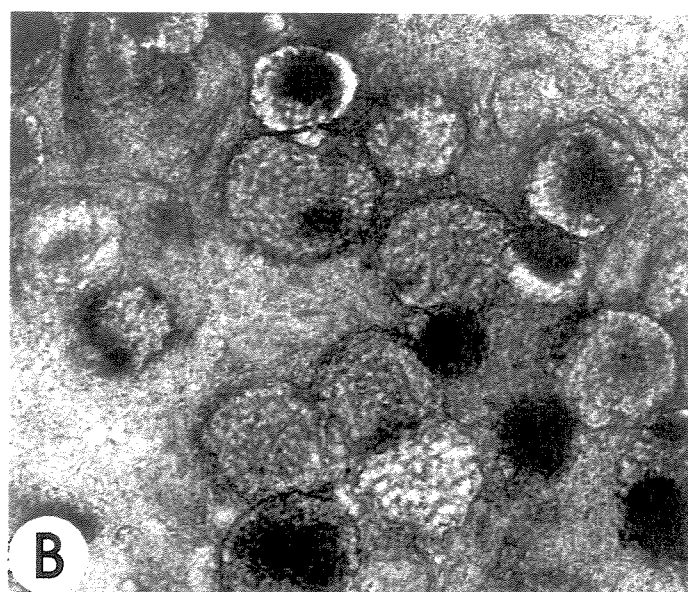
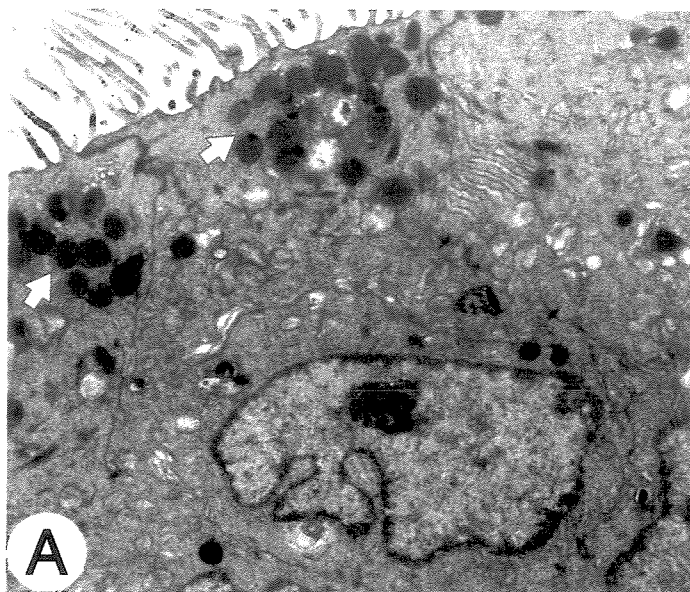


Fig. 13. Região da A dos ratos UChA e UChB.

A) A dos ratos UChA: grau de elétron-densidade variável entre células secretoras (asterisco), núcleos regulares alongados com chanfraduras (N), vacúolos e cisternas dilatadas (seta). 3250X.

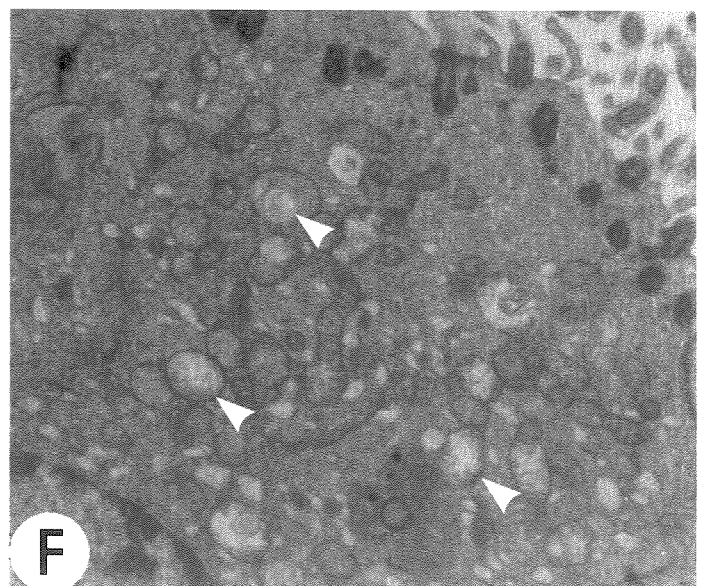
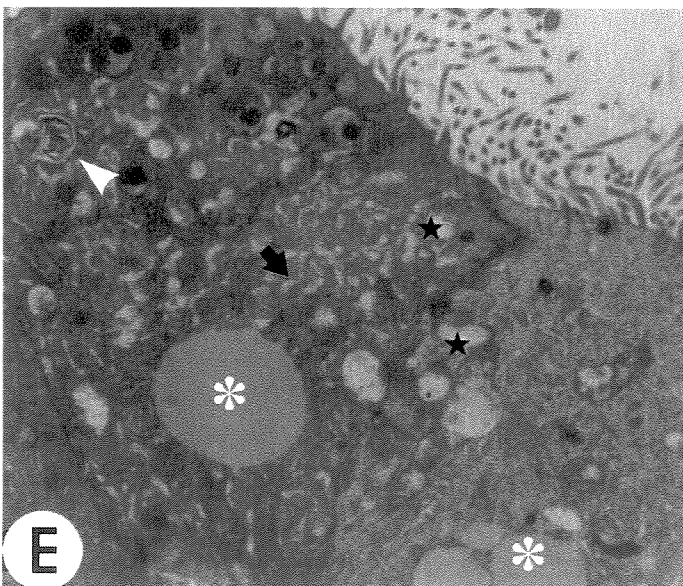
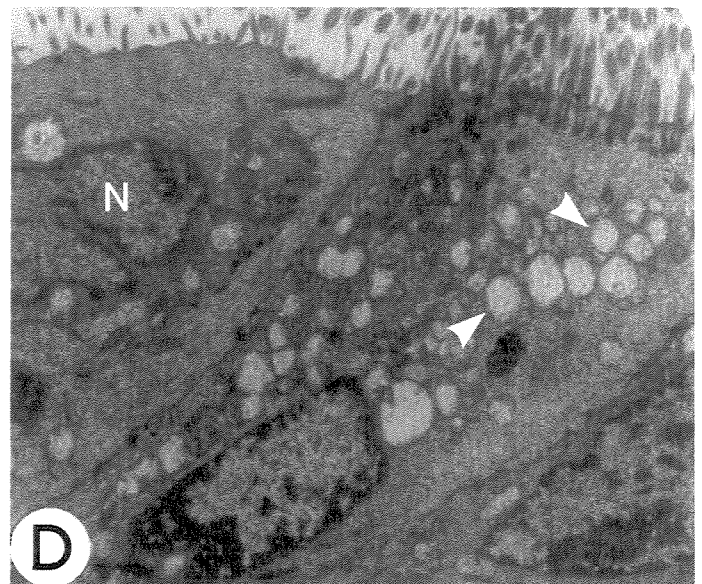
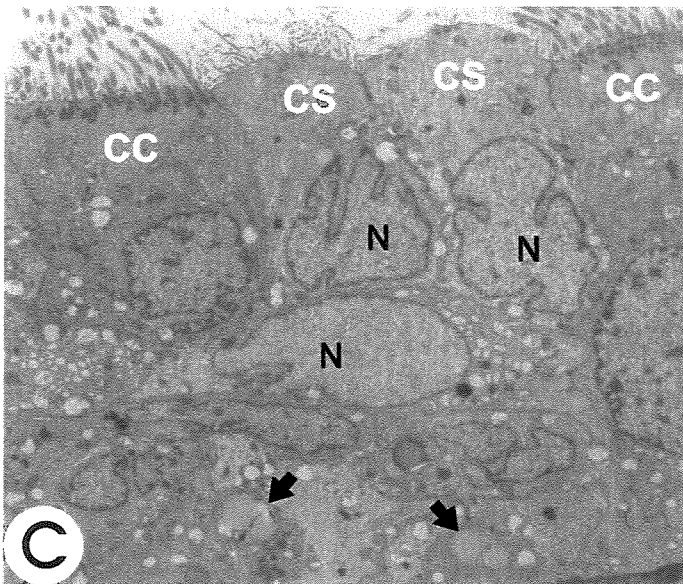
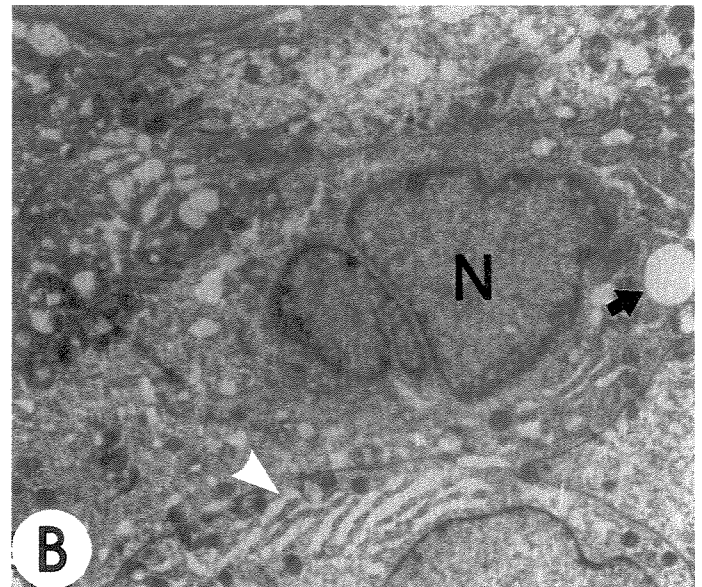
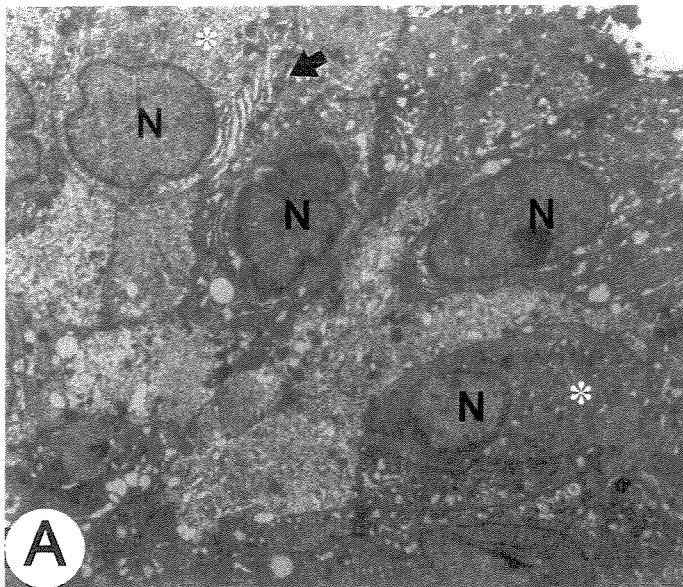
B) A dos ratos UChA: CS: núcleo irregular (N), cisternas dilatadas (cabeça de seta) e gota lipídica na porção infra-nuclear (seta). 7750X.

C) A dos ratos UChB: células secretoras (CS) e ciliadas (CC) intercaladas, núcleos com chanfraduras (N) e gotas lipídicas na porção infra-nuclear (seta). 3250X.

D) A dos ratos UChB: CC: núcleo com chanfradura (N) e mitocôndrias edemaciadas (cabeça de seta). 7750X.

E) A dos ratos UChB: CS: gotas lipídicas na porção supra-nuclear (asterisco), corpo lamelar (cabeça de seta), mitocôndrias edemaciadas (estrela), vacúolos e cisternas dilatadas (seta). 9750X.

F) A dos ratos UChB: CC: mitocôndrias edemaciadas na porção apical (cabeça de seta). 13250X.



V: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A região In do grupo controle apresentou-se com predomínio de CS preenchidas com microvilos curtos (Fig. 14A).

A região In dos ratos UChA apresentou células contendo microvilos curtos em sua superfície e inúmeras protrusões apicais, geralmente destituídas de microvilos. Algumas protrusões delgadas (protrusões citoplasmáticas longas de CS) estiveram presentes entre as CS (Fig. 14D).

A região In dos ratos UChB apresentou algumas protrusões apicais “murchas” destituídas de microvilos (Fig. 14E). As células epiteliais apresentaram-se recobertas por microvilos curtos em sua superfície (Fig. 14E,F) e, em algumas regiões, apresentaram aumento dos espaços intercelulares tornando seus limites superficiais nítidos (Fig. 14F).

O epitélio da mucosa do I do grupo controle apresentou predomínio de CS, densamente preenchidas com microvilos (Fig. 14B), CS com protrusões apicais e CC. Os microvilos, mais freqüentes, e os cílios estiveram distribuídos regularmente por toda a superfície do epitélio (Fig. 14B).

Na região do I dos ratos UChA, o exame das superfícies apicais demonstrou a presença de CS com microvilos e limites nítidos e cílios de CC esporádicas (Fig. 14G). Na luz do epitélio da mucosa, foram observadas gotas lipídicas grandes (Fig. 14G).

O epitélio da região do I dos ratos UChB apresentou morfologia alterada. Comparada aos grupos controle e UChA, não foram observados limites celulares nítidos. Os cílios e microvilos apresentaram distribuição irregular, formando uma superfície apical do epitélio vazada (menos íntegra), lembrando o aspecto de queijo suíço (Fig. 14H,I). Grupos de gotas lipídicas de diferentes tamanhos foram observados na lâmina própria (Fig. 14I) e inúmeros vacúolos distribuídos por todo o citoplasma das células.

O epitélio da mucosa da A do grupo controle apresentou CS com limites superficiais nítidos e grupos de CC intercaladas (Fig. 14C).

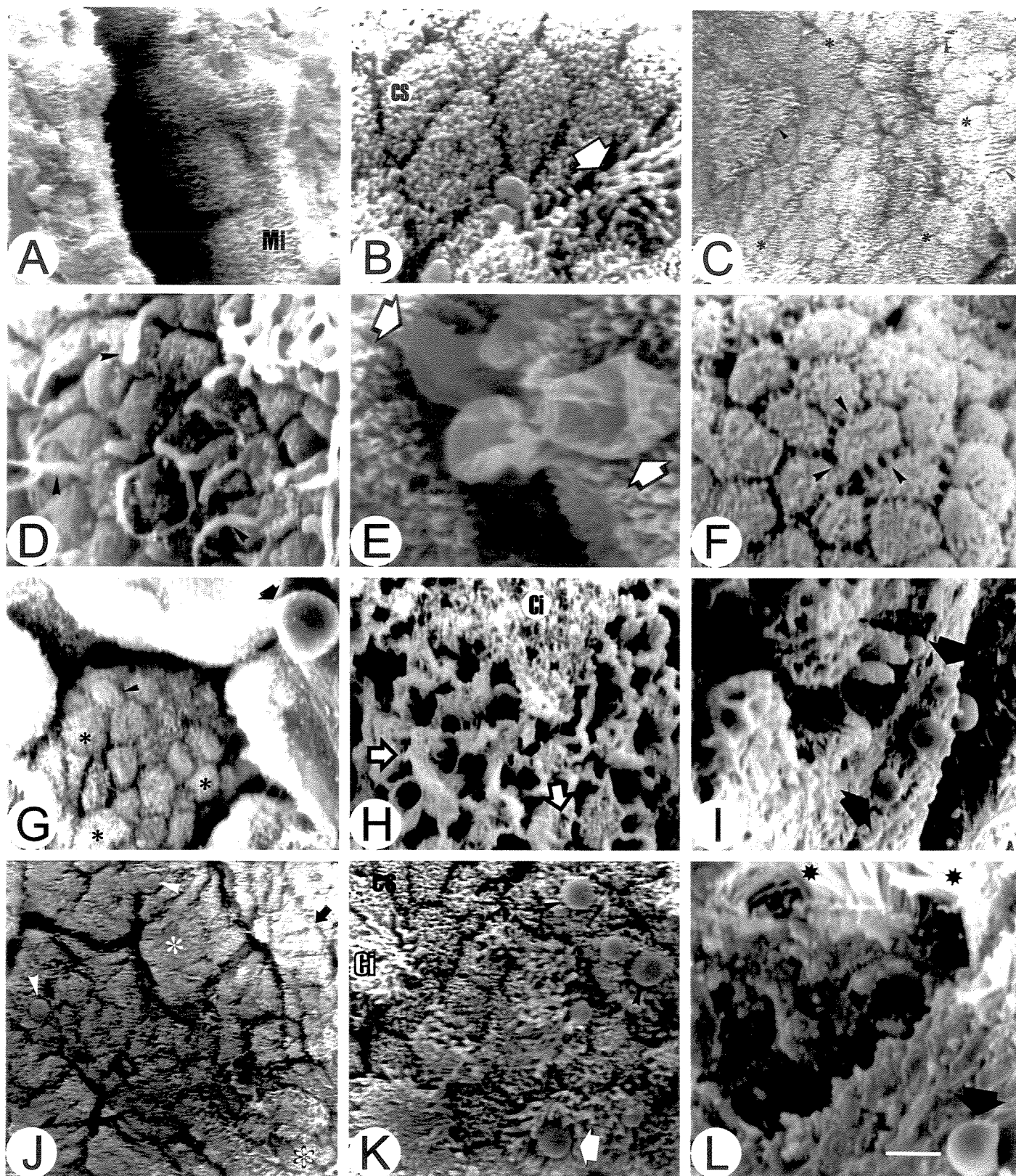
A região da A dos ratos UChA apresentou CS e grupos de CC intercaladas (Fig. 14J). Não foram observadas protrusões apicais nessa região e as dobras da mucosa apresentaram aspecto enrugado (Fig. 14J) comparado ao grupo controle. No citoplasma das

células, observou-se gotas lipídicas e vacúolos desde a porção basal até a apical. Ao analisar a superfície, também foram observadas gotas lipídicas sobre o epitélio (**Fig. 14J**).

A região da A dos ratos UChB apresentou CS com limites superficiais nítidos e CC intercaladas (**Fig. 14K**). Numerosas gotas de lipídios de tamanhos diferentes foram observadas sobre o epitélio, inclusive o momento da expulsão de uma gota lipídica por uma CC em direção à luz (**Fig. 14K**). Os cílios e microvilos estiveram distribuídos irregularmente, apresentando-se agrupados ou formando o aspecto característico de queijo suíço (vazado). Também foram observados vacúolos no citoplasma e gotas lipídicas de tamanhos variados na lâmina própria do epitélio (**Fig. 14L**).

Fig. 14. Eletromicrografia de varredura das regiões In, I e A dos ratos controle, UChA e UChB.

- A)** In dos ratos controle: microvilos curtos (Mi). Barra=687 μ m.
- B)** I dos ratos controle: microvilos de células secretoras (CS) e cílios intercalados (seta). Barra=2142 μ m.
- C)** A dos ratos controle: superfície do epitélio com células secretoras (asterisco) e ciliadas (cabeça de seta). Barra=687 μ m.
- D)** In dos ratos UChA: protrusões citoplasmáticas longas de células secretoras (cabeça de seta). Barra=1212 μ m.
- E)** In dos ratos UChB: protrusões apicais “murchas” (seta) e microvilos (Mi). Barra=1794 μ m.
- F)** In dos ratos UChB: espaços intercelulares aumentados (cabeça de seta). Barra=1271 μ m.
- G)** I dos ratos UChA: presença de células secretoras com limites nítidos (asterisco), cílios (cabeça de seta) e gotas lipídicas grandes (seta) na luz do epitélio. Barra=604 μ m.
- H)** I dos ratos UChB: distribuição irregular de cílios (Ci) e microvilos (seta) formando o epitélio vazado (aspecto de queijo suíço). Barra=1159 μ m.
- I)** I dos ratos UChB: grupo de gotas lipídicas na LP (seta). Barra=467 μ m.
- J)** A dos ratos UChA: aspecto enrugado da superfície do epitélio com células secretoras (asterisco), ciliadas (seta) e gotas lipídicas (cabeça de seta). Barra=687 μ m.
- K)** A dos ratos UChB: células secretoras (CS), ciliadas (Ci) e gotas lipídicas (cabeça de seta) sobre o epitélio. Notar o momento da expulsão da gota lipídica pela célula ciliada (seta). Barra=1120 μ m.
- L)** A dos ratos UChB: gotas lipídicas (seta) de tamanhos variados na LP e distribuição irregular dos cílios (estrela). Barra=1632 μ m.



V: Morfometria da Tuba Uterina

Áreas citoplasmática e nuclear da tuba uterina proximal:

A área do citoplasma e do núcleo da região In (CS) dos grupos UChA e UChB foram menores comparadas ao controle. A área do citoplasma da região do I (CS) dos grupos UChA e UChB foi menor comparada ao controle. A área do citoplasma e do núcleo da região I (CC) dos grupos UChA e UChB foram menores comparadas ao controle. A área do citoplasma e do núcleo da região A (CS e CC) dos grupos UChA e UChB foram menores comparadas ao controle (Tab. 2 e Tab. 3).

Altura das células epiteliais da tuba uterina proximal:

A altura das células epiteliais da tuba uterina da região In (CS) dos grupos UChA e UChB foi menor comparada ao controle. A altura das células epiteliais da região do I (CC) dos grupos UChA e UChB foi menor comparada ao controle {para as CS da mesma região, não houve diferença significativa entre os grupos}. A altura das células epiteliais da região A (CS e CC) dos grupos UChA e UChB foi menor comparada ao controle (Tab. 4).

Tab. 2. Média e desvio-padrão da área do citoplasma (μm^2) das células secretoras (CS) e ciliadas (CC) da tuba uterina proximal (regiões: intramural (In), istmo (I) e ampola (A)) dos grupos controle (C), UChA e UChB.

Grupo	Região				
	In(CS)	I(CS)	I(CC)	A(CS)	A(CC)
C	2312,33 $\pm$ 414,39b A	2522,50 $\pm$ 242,75b A	1605,67 $\pm$ 164,15c A	1351,83 $\pm$ 122,55b A	1703,16 $\pm$ 127,74b A
UChA	1560,00 $\pm$ 270,80a A	2082,17 $\pm$ 247,56ab A	936,33 $\pm$ 104,71b A	1083,67 $\pm$ 173,98a A	1092,17 $\pm$ 161,83a A
UChB	1762,50 $\pm$ 212,99a A	2068,00 $\pm$ 421,95a A	758,00 $\pm$ 70,27a A	1052,67 $\pm$ 176,36a A	1210,67 $\pm$ 205,42a A

Médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente.

Tab. 3. Média e desvio-padrão da área do núcleo (μm^2) das células secretoras (CS) e ciliadas (CC) da tuba uterina proximal (regiões: intramural (In), istmo (I) e ampola (A)) dos grupos controle (C), UChA e UChB.

Grupo	Região				
	In(CS)	I(CS)	I(CC)	A(CS)	A(CC)
C	790,00 $\pm$ 43,99b A	680,69 $\pm$ 36,96a A	537,17 $\pm$ 25,54c A	645,67 $\pm$ 31,81b A	512,83 $\pm$ 35,21b A
UChA	653,17 $\pm$ 81,98a B	680,67 $\pm$ 68,51a B	342,17 $\pm$ 43,31b A	545,83 $\pm$ 48,89a AB	415,83 $\pm$ 56,92a AB
UChB	697,33 $\pm$ 43,19a B	687,83 $\pm$ 103,17a B	270,33 $\pm$ 18,75a A	564,00 $\pm$ 73,06a AB	458,33 $\pm$ 47,60ab AB

Médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente.

Os grupos tratados (UChA e UChB) apresentaram menor área citoplasmática comparados ao grupo controle para as regiões In, I e A, independente do tipo celular analisado (CS ou CC). O grupo UChB apresentou menor área citoplasmática das CC da região do I comparado ao grupo UChA. As regiões com seus respectivos tipos celulares não diferiram para um mesmo grupo considerado.

Os grupos tratados (UChA e UChB) apresentaram menor área nuclear comparados ao grupo controle para as regiões In (CS), I (CC) e A (CS e CC). Porém, não se observou diferença entre o grupo controle e os grupos tratados quando analisada a área nuclear das CS da região do I. As CS e CC apresentaram a mesma área nuclear no grupo controle, independente das regiões. Porém, os grupos tratados apresentaram variação da área nuclear, sendo menores nas CC da região do I.

Tab. 4. Média e desvio-padrão da altura (μm) das células secretoras (CS) e ciliadas (CC) da tuba uterina proximal (regiões: intramural (In), istmo (I) e ampola (A)) dos grupos controle (C), UChA e UChB.

Grupo	Região				
	In(CS)	I(CC)	I(CS)	A(CC)	A(CS)
C	124,33 $\pm$ 15,33b A	81,00 $\pm$ 5,55b A	183,00 $\pm$ 22,78a B	98,83 $\pm$ 8,38b A	97,33 $\pm$ 7,06b A
UChA	98,83 $\pm$ 11,27a B	53,17 $\pm$ 4,45a A	158,33 $\pm$ 16,16a C	77,17 $\pm$ 6,74a B	84,50 $\pm$ 9,01a B
UChB	109,17 $\pm$ 6,97a C	48,67 $\pm$ 2,25a A	163,83 $\pm$ 25,93a D	79,67 $\pm$ 6,06a B	82,83 $\pm$ 8,04a B

Médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente.

Os grupos tratados (UChA e UChB) apresentaram menor altura das células epiteliais comparados ao grupo controle para as regiões In (CS), I (CC) e A (CS e CC). Porém, não se observou diferença entre o grupo controle e os grupos tratados quando analisada a altura das CS da região do I. As regiões com seus respectivos tipos celulares diferiram nos grupos tratados (UChA e UChB).

VI: Dosagem de Hormônios

Dosagens hormonais de FSH (ng/mL), LH (ng/mL), progesterona (ng/mL) e estradiol (pg/mL)

Tab. 5. Mediana e semi-amplitude total segundo grupos controle, UChA e UChB.

Variável	Grupo			Resultado do teste estatístico
	Controle	UChA	UChB	(P - valor)
FSH	5,25 ± 2,85	6,5 ± 3,85	3,90 ± 2,85	3,06 (P>0,05)
LH	0,70 ± 4,50	0,40 ± 0,85	0,20 ± 1,15	3,94 (P>0,05)
Progesterona	22,16 ± 12,79	19,34 ± 13,28	30,25 ± 12,97	2,67 (P>0,05)
Estradiol	43,57 ± 19,22	47,66 ± 37,90	44,73 ± 39,29	0,62 (P>0,05)

Não houve diferença significativa entre os grupos controle, UChA e UChB nas dosagens plasmáticas dos hormônios avaliados. No entanto, ressalta-se a enorme variabilidade observada nos valores individuais das amostras coletadas.

DISCUSSÃO

O rato albino (*Rattus norvegicus*) apresenta ciclo estral do tipo poliétrico (o ciclo estral termina num período de diestro que emerge como o proestro no ciclo estral seguinte) com quatro fases distintas: proestro, estro, metaestro e diestro (Long & Evans, 1922; Fox & Laird, 1970). O ciclo estral do rato é curto (duração de quatro a seis dias) e regular (Young *et al.*, 1941). O esfregaço vaginal representa um método simples, não invasivo e de fácil

monitoramento, para a determinação do padrão normal da atividade ovariana, assim como uma ferramenta importante em estudos toxicológicos (Cooper *et al.*, 1993).

O alcoolismo na mulher está frequentemente associado a severos desarranjos da função reprodutiva, incluindo distúrbios menstruais como dismenorréia, fluxo menstrual intenso, desconforto pré-menstrual (Wilsnack *et al.*, 1984), menstruações irregulares (Jones *et al.*, 1980; Jones-Saumty *et al.*, 1981) e amenorréia, infertilidade e abortos espontâneos (Bearn *et al.*, 1956; Hugues *et al.*, 1980; Harlap & Shiono, 1980; Kaufman, 1997; Wolfe *et al.*, 2000; Kesmodel *et al.*, 2002). Moskovic (1975), Jones-Saumty *et al.* (1981) e Becker *et al.* (1989) observaram alta frequência de menstruação acíclica em mulheres alcoólicas crônicas. O álcool também induz irregularidade menstrual em primatas como consequência de seus efeitos tóxicos no eixo hipotálamo-hipófise e nos ovários (Mello *et al.*, 1983). Estudos em animais têm demonstrado que a administração crônica de álcool produz falhas no funcionamento dos ovários em ratas (Kieffer & Ketchel, 1970), amenorréia e atrofia do útero em macacas (Mello *et al.*, 1983) e interrupção do ciclo estral na rata (Eskay *et al.*, 1981).

No grupo controle das ratas do estudo em questão, constatou-se abundância dos tipos celulares para as respectivas fases (proestro, estro, metaestro, diestro) comparado à linhagem UChA e UChB. O número de ciclos, segundo grupo de estudo, não diferiu estatisticamente, embora o tempo de permanência em cada fase do ciclo tenha variado, indicando que a duração de uma mesma fase foi diferente de acordo com o grupo analisado. Os grupos UChA e UChB apresentaram coeficiente de variação maior, portanto maior variabilidade, assim como mulheres alcoólicas crônicas em relação à extensão do ciclo menstrual (Becker *et al.*, 1989). Segundo Cooper *et al.* (1993), componentes que interferem no ciclo ovariano podem induzir um padrão de estro vaginal constante, pseudogravidez repetitiva ou condições de anestro. Walker *et al.* (1980) constataram que componentes que induzem um padrão de estro prolongado interferem com o controle neuroendócrino da ovulação, embora fêmeas possam ser sexualmente receptivas e induzidas a ovularem através da monta em estro prolongado (Brown-Grant *et al.*, 1973). Apesar dos animais dos grupos UChA e UChB demonstrarem ciclo estral irregular (estros prolongados), a morfologia dos tipos celulares não diferiu do grupo controle.

O epitélio da tuba uterina do rato é formado por dois tipos de células: secretora (CS) e ciliada (CC). A tuba uterina proximal é constituída por três regiões distintas e seqüentes: intramural (In), istmo (I) e ampola (A).

Na região In, observou-se que as dobras epiteliais em direção à luz apresentaram-se disformes, adquirindo proporções crescentes do grupo UChA para o grupo UChB. O epitélio apresentou heterogeneidade em altura devido à formação de lacunas grandes com conteúdo ou não em seu interior. As lacunas caracterizaram-se por espaços no interior do epitélio formados pelo rearranjo das células, possivelmente, na tentativa da manutenção da integridade da mucosa, comprovada através da heterogeneidade da altura do epitélio a partir da lâmina própria. Vacúolos estiveram distribuídos pelo citoplasma das células. A análise citomorfométrica da região In mostrou que tanto as áreas citoplasmática e nuclear quanto a altura das CS dos grupos tratados foram menores comparadas ao grupo controle. As colorações HE e AT apresentaram-se heterogêneas, sendo que o grupo UChB apresentou epitélio com aspecto diafanizado (coloração mais fraca). Os núcleos apresentaram-se gradativamente mais condensados, comparativamente do grupo UChA para o UChB, sendo que foram observados núcleos alterados no grupo UChB. A reação ao PAS apresentou-se restrita à extremidade apical devido às glicoproteínas e ao glicocálix das CS, sendo que no grupo UChB esteve mais acentuada. Em criomicrotomia, observou-se intensa retração do tecido nos grupos tratados e, a reação à FA apresentou-se não tão delimitada porém, restrita ao epitélio para o grupo UChA e, mais intensa e extensiva ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular no grupo UChB.

A região do I dos grupos tratados apresentou heterogeneidade em altura, sendo que as CC apresentaram-se mais baixas comparadas ao controle. A citomorfometria da região comprovou que tanto as áreas citoplasmática e nuclear quanto a altura das CC dos grupos tratados foram menores comparadas ao controle, enquanto que para as CS somente a área citoplasmática apresentou diferença significativa entre os grupos, sendo menor comparada ao controle. O epitélio apresentou lacunas grandes com conteúdo ou não em seu interior. A presença de conteúdo em seu interior foi indicativa do isolamento de restos celulares (produtos do metabolismo celular). As colorações HE e AT apresentaram-se heterogêneas e

os núcleos apresentaram-se mais condensados comparados ao controle. A reação ao PAS no grupo UChA apresentou-se extensa desde a porção supra-nuclear até a extremidade apical, com destaque aos longos microvilos e, intensa comparada ao I do controle. A reação ao PAS no grupo UChB apresentou-se mais intensa, de forma que os longos microvilos apresentaram-se como um borrão na superfície comparado ao UChA. Também foi observada intensa retração do tecido nos grupos tratados e, a reação à FA na porção supra-nuclear apresentou-se não delimitada e restrita ao epitélio para o grupo UChA e, mais intensa e extensiva ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular no grupo UChB.

Na região da A dos grupos tratados, observou-se menor quantidade de dobras epiteliais em direção à luz, comparada ao controle, amplificando-a. O epitélio apresentou heterogeneidade em altura devido à formação de lacunas maiores e em maior número no grupo UChB, comparado ao UChA, com conteúdo ou não em seu interior. A análise citomorfométrica da região da A mostrou que tanto as áreas citoplasmática e nuclear quanto a altura das CS e das CC dos grupos tratados foram menores comparadas ao grupo controle. As colorações HE e AT apresentaram-se heterogêneas, sendo que o grupo UChB apresentou epitélio com aspecto diafanizado. Os núcleos apresentaram-se mais condensados nos grupos tratados comparados ao controle. A tuba uterina do grupo controle apresentou ampla luz sem conteúdo na região da A, enquanto os grupos tratados apresentaram oócitos em quantidade. Laura *et al.* (2003) constataram aumento no número de corpos lúteos e folículos atresícos em ratas alcoólicas tratadas com 30% de etanol. Em contraposição, Jung & Russfield (1972) observaram ausência de corpos lúteos em mulheres alcoólicas. Ratas tratadas com 5% de etanol durante 49 dias apresentaram ovários com folículos imaturos, ausência de corpos lúteos, hemorrágicos e *albicans* (Van Thiel *et al.*, 1977, 1978). Infere-se que o álcool induza hiperovulação nas ratas tratadas, observada pelo aumento do número de oócitos do grupo UChA para o UChB. A reação ao PAS apresentou-se tênue na extremidade apical e discreta no citoplasma das CS do grupo UChA e, no grupo UChB foi mais intensa na extremidade apical comparada aos grupos UChA e controle. Como nas regiões citadas anteriormente, a região da A apresentou intensa retração do tecido nos grupos tratados e, a reação à FA na porção supra-nuclear apresentou-se mais

homogênea e menos pontual no grupo UChA, comparado ao controle, e mais intensa e extensiva ao tecido conjuntivo subjacente e camada muscular no grupo UChB.

A reação positiva observada na tuba uterina proximal foi indicativa da presença de grande número de lisosomos localizados na porção supra-nuclear, mas não atingindo as extremidades apicais das CS, local de maior incidência de grânulos de secreção, e CC. Os lisosomos são capazes de degradar material intra e extracelular desnecessário em monômeros biológicos, representando peça central do Sistema Endossômico-lisosômico que inclui vesículas derivadas do aparelho de Golgi, vacúolos fusionados com lisosomos primários e corpos residuais com material não digerido (Uchiyama, 2001). Os lisosomos estiveram presentes em maior número nos grupos tratados comparado ao controle, sendo que no grupo UChB foram extensivos em pontos do tecido conjuntivo subjacente e na camada muscular.

As observações histológicas da tuba uterina proximal não apenas revelaram diferenças entre os grupos tratados e o controle como entre os grupos UChA e UChB, em concordância com os resultados de Van Thiel *et al.* (1977, 1978) e discordância com os resultados de Martinez *et al.* (1999).

A região In dos grupos tratados apresentou vacúolos e cisternas dilatadas. Os núcleos com formatos irregulares foram indicativos de células em degeneração. Microvilos e grânulos de secreção escassos, além da presença de grande quantidade de gotas lipídicas demonstraram alteração morfológica e funcional. Constatou-se também que a degeneração adquiriu proporções crescentes do grupo UChA para o grupo UChB demonstradas pelo aumento de vacúolos, cisternas dilatadas e mitocôndrias não preservadas. Assim como a região In dos grupos tratados, o I apresentou vacúolos, cisternas dilatadas e grande quantidade de gotas lipídicas. Comparados ao grupo controle, houve alteração quanto à elétron-densidade dos microvilos. Infere-se que devido à alteração da morfologia dos microvilos, o papel de células absortivas de substâncias de água da luz para o sangue esteja prejudicado. Os formatos irregulares de núcleos com chanfraduras também foram indicativos do processo degenerativo. O grupo UChB apresentou, ainda, corpos lamelares, indicativos de célula em renovação ou morte celular, grande quantidade de corpos

multivesiculados e grânulos de secreção com elétron-densidade alterada, além de cílios com distribuição irregular e mitocôndrias pouco preservadas. Os microvilos das CS da região da A dos grupos tratados apresentaram-se elétron-densos e, freqüentemente, agrupados. Os núcleos apresentaram formato irregular com chanfraduras, em maior quantidade no grupo UChB. Vacúolos, cisternas dilatadas e mitocôndrias não preservadas foram observadas em CS e CC. O aumento da quantidade de gotas lipídicas e a presença de corpos lamelares foram as principais diferenças entre os grupos tratados.

As tubas uterinas proximais dos grupos alcoólicos confirmaram a presença de gotas lipídicas nas células epiteliais. Essas gotas eram esféricas, de tamanhos e localização diferentes e, estiveram presentes em grande número. Da mesma forma, vacúolos distribuídos por toda a célula. Sugere-se que as gotas gigantes presentes na luz do epitélio tenham sido formadas pelo agrupamento de gotas menores e que o aspecto de queijo suíço, dado pela distribuição dos cílios e microvilos, seja devido à exocitose de gotas lipídicas de células abarrotadas para a luz do epitélio na tentativa da homeostase. O aumento do número de gotas lipídicas do grupo UChA para o grupo UChB demonstrou que o metabolismo celular esteve alterado devido à ação do álcool e, que as células epiteliais sofreram desequilíbrio osmótico, indicado pelo processo degenerativo responsável pela morte celular. As células epiteliais da tuba uterina produzem várias moléculas funcionais, tais como enzimas e fatores de crescimento (Morishita *et al.*, 1992; Carlsson *et al.*, 1993). Enquanto as CC são responsáveis pelo transporte dos oócitos no interior da tuba uterina (Odor & Blandau, 1973), as CS produzem e secretam proteínas e glicoproteínas formando o fluido (Oliphant, 1986; Hunter, 2002; Bhatt *et al.*, 2004). Ellington *et al.* (1993a,b) e Suarez (2001) sugerem que a interação entre as células epiteliais (CS e CC) da tuba uterina e os gametas masculinos é necessária para o término da maturação dos espermatozóides. Alguns estudos sugerem que o I representa sítio de estocagem do esperma e que as células epiteliais podem manter a viabilidade e a capacidade de fertilização do esperma durante o período pré-ovulatório (Smith *et al.*, 1987; Smith & Yanagimachi, 1989; Pollard *et al.*, 1991; Suarez *et al.*, 1991; Suarez, 2002; Petrunkina *et al.*, 2004). Para Abe (1996), a porção da A é a região com o maior diâmetro e representa o local da fertilização na maioria dos mamíferos. Infere-se que, devido às alterações dos cílios e microvilos, a qualidade, a

renovação e o transporte do fluido produzido pelas células das várias regiões da tuba uterina proximal estejam alterados.

Alterações hormonais regulam a quantidade e a composição do fluido da tuba uterina (Urzua *et al.*, 1970; Blandau, 1971; Beier, 1974). O fluido é acumulado na luz da tuba uterina, distendendo-a, e sofre a influência de estrógenos no estágio de estro. A progesterona provoca diminuição da luz da tuba uterina e reabsorção do fluido no estágio de diestro. A diferenciação das células epiteliais, o número e a liberação dos grânulos de secreção das CS da tuba uterina estão relacionados com os efeitos dos hormônios esteróides ovarianos (Hafez, 1970; Brenner *et al.*, 1974; Verhage & Brenner, 1975; Odor *et al.*, 1980; Abe & Oikawa, 1993). Alterações hormonais observadas no sistema genital feminino induzidas pelo álcool têm sido relatadas. Sandor *et al.* (1981) descreveu a presença de etanol nos fluidos das tubas uterinas, corroborando com a idéia de um possível efeito direto do etanol em problemas de pré-implantação de embriões em ratas alcoólicas. No presente estudo, não houve diferença significativa entre os grupos controle, UChA e UChB nas dosagens plasmáticas dos hormônios folículo-estimulante (FSH), luteinizante (LH), progesterona e estradiol, embora o nível do hormônio LH tenha sido menor nos grupos tratados comparado ao controle e, o nível do estradiol maior nos grupos tratados comparado ao controle. Segundo Poschl & Seitz (2004), o aumento do nível de estradiol, mediado pelo álcool, pode ser em parte responsável pelo risco aumentado de câncer de mama. Ratas tratadas com álcool apresentaram níveis significativamente menores nas concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona (Van Thiel *et al.*, 1977, 1978), ao contrário de Gavalier *et al.* (1980) que descreveram níveis semelhantes de estradiol para os animais alcoólicos e controle. Gavalier *et al.* (1980) verificaram que a concentração do hormônio folículo-estimulante (FSH) foi maior comparada ao estradiol e à progesterona. Os autores sugerem que a toxicidade do etanol está relacionada ao desequilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Les Dees & Skelley (1990) observaram que ratas imaturas tratadas com 5% de etanol mostraram diminuição nos níveis plasmáticos dos hormônios luteinizante (LH) e do crescimento (GH), ao contrário de Mello *et al.* (1983) que observaram baixos níveis do LH somente em macacas submetidas ao alcoolismo experimental tratadas com

altas doses de etanol. Em concordância com a literatura, ressalta-se a enorme variabilidade observada nos valores individuais das amostras.

Inferese ainda que, devido às alterações observadas nas células epiteliais resultantes da formação de vacúolos encontrados em abundância distribuídos por toda a célula, cisternas do retículo endoplasmático dilatadas, mitocôndrias não preservadas e, a presença de grande número de gotas lipídicas e lisossomos, relacionados à degradação de organelas celulares, acredita-se que o álcool induza inicialmente morte celular diferente da apoptose. Da mesma forma, Laura *et al.* (2003) observaram ultra-estruturalmente que folículos ovarianos de ratas alcoolizadas mostraram vacuolização e aumento tanto no tamanho como no número de gotas lipídicas. Martinez *et al.* (1993) e Martinez *et al.* (1999) observaram alterações semelhantes aos resultados obtidos como cisternas do retículo endoplasmático dilatadas e grande acúmulo de gotas lipídicas. Conclui-se que devido às alterações morfológicas e, conseqüentemente, funcionais o processo reprodutivo dos ratos UCh esteja comprometido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in citological and functional aspects of the oviductal secretory cells. **Histol. Histopathol.**, v.11, p.743-768, 1996.
- ABE, H.; OIKAWA, T. Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. **Anat. Rec.**, v.235, p.390-398, 1993.
- BANZATTO, A.D.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: Funep, 1989. 247p.
- BARKA, T. A simple azo dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. **Nature**, v.187, p.248, 1960.
- BHATT, P.; KADAM, K.; SAXENA, A.; NATRAJ, U. Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. **Indian J. Exp. Biol.**, v.42, p.1043-1055, 2004.

- BEARN, A.G.; KUNKEL, H.G.; SLATER, R.J. The problem of chronic liver disease in young women. **Am. J. Med.**, v.21, p.3-15, 1956.
- BECKER U.; TONNASSEN H.; KAAS-CLAESSON N.; GLUUD C. Menstrual disturbances and fertility in chronic alcoholic women. **Drug Alcohol Depend.**, v.24, p.75-82, 1989.
- BEIER, H.M. Oviductal and uterine fluids. **J. Reprod. Fertil.**, v.37, p.221-237, 1974.
- BLANDAU, R.J. **The Biology of the Blastocyst**. Chicago: University of Chicago Press, 1971.
- BRENNER, R.M.; RESKO, J.A.; WEST, N.B. Cyclic changes in oviductal morphology and residual cytoplasmic estradiol binding capacity induced by sequential estradiol-progesterone treatment of spayed rhesus monkeys. **Endocrinology**, v.95, p.1094-1104, 1974.
- BROWN-GRANT, K.; DAVIDSON, J.M.; GRIEG, F. Induced ovulation in albino rats exposed to constant light. **J. Endocrinol.**, v.57, p.7-22, 1973.
- BURSTONE, M.S. Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. **J. Ntl. Cancer Inst.**, v.21, p.523, 1958.
- CARLSSON, B.; HILLENSJO, T.; NILSSON, A.; TORNELL, J.; BILLIG, H. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the rat Fallopian tube: possible autocrine and paracrine action of Fallopian tube-derived IGF-I on the Fallopian tube and on the preimplantation embryos. **Endocrinology**, v.133, p.2031-2039, 1993.
- COOPER, R.L.; GOLDMAN, J.M.; VANDENBERGH, J.G. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. **Female Reprod. Toxicol.**, v.3, p.45-56, 1993.
- ESKAY, R.L.; RYBACK, R.S.; GOLDMAN, M.; MAJCHROWICZ, E. Effect of chronic ethanol administration on plasma levels of LH and the estrous cycle in the female rat. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.5, p.204-206, 1981.
- ELLINGTON, J.E.; BALL, B.A.; YANG, X. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.203-208, 1993a.

- ELLINGTON, J.E.; BALL, B.A.; BLUE, B.J.; WILKER, C.E. Capacitation-like membrane changes and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.1505-1510, 1993b.
- FOX, R.R.; LAIRD, C.W. Sexual Cycles. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970. 375p.
- GAVALER, J.S.; VAN THIEL, D.A.; LESTER, R. Ethanol: a gonadal toxin in the mature rat of both sexes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.4, p.271-276, 1980.
- GREEN, H.G. Infants of alcoholic mothers. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.118, p.7313-7316, 1974.
- HAFEZ, E.S.E. Female reproductive organs. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970. 375p.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.
- HALLIDAY, H.L.; REID, M.; McCLURE, G. Result of heavy drinking in pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, v.89, p.892-895, 1982.
- HAMID, A.; HADI, J.A.; CASTILLO, R.A. Alcohol on reproductive function: a review. *Obstet. Gynecol.*, v.42, p.69-74, 1987.
- HANSON, J.W.; JONES, K.L.; SMITH, D.W. Fetal alcohol syndrome: Experience with 41 patients. *J. Am. Med. Assoc.*, v.235, p.1458-1460, 1976.
- HARLAP, S.; SHIONO, P.H. Alcohol, smoking and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. *Lancet*, v.2, p.173-176, 1980.
- HUGUES, J.N.; COFTE, T.; PERRET, G.; JAYLE, M.S.; SEBAOUN, J.; MODIGLIANI, E. Hypothalamo-pituitary ovarian function in 31 women with chronic alcoholism. *Clin. Endocrinol.*, v.12, p.543-551, 1980.
- HUNTER, R.H. Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. **Reprod. Domest. Anim.**, v.37, p.186-190, 2002.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 642p.
- JONES, B.M.; JONES, M.K.; HATCHER, E.M. Cognitive deficits in women alcoholics as a function of gynecological status. *J. Stud. Alcohol*, v.41, p.140-146, 1980.

- JONES-SAUMTY, D.J.; FABIAN, M.S.; PARSONS, O.A. Medical status and copritive functioning in alcoholic women. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.5, p.372-377, 1981.
- JUNG, Y.; RUSSFIELD, A.B. Prolactin cells in the hypophysis of cirrhotic patients. *Arch. Pathol.*, v.94, p.265-269, 1972.
- KAUFMAN, M.H. The teratogenic effects of alcohol following exposure during pregnancy, and its influence on the chromosome constitution of the pre-ovulatory egg. *Alcohol Alcohol.*, v.32, p.113-128, 1997.
- KESMODEL, U.; WISBORG, K.; OLSEN, S.F.; HENRIKSEN, T.B.; SECHER, N.J. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol.*, v.37, p.87-92, 2002.
- KIEFFER, J.D.; KETCHEL, M.M. Blockade of ovulation in the rat by ethanol. *Acta. Endocrinol.*, v.65, p.117-124, 1970.
- KILLIAN, G.J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.141-153, 2004.
- LAPOINTE, J.; BILODEAU, J.F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1157-1164, 2003.
- LAURA, I.A.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Ultrastructural and morphometric analysis on the ovary of Wistar rats after chronic ethanol ingestion. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.35, p.167-176, 2003.
- LES DEES, W.; SKELLEY, C.W. Effects of ethanol during the onset of female puberty. *Neuroendocrinology*, v.51, p.64-69, 1990.
- LONG, J.A.; EVANS, H.M. The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. California*, v.6, p.1-148, 1922.
- MARDONES, J.; SEGOVIA, N.; HEDERRA, A. Heredity of alcohol preferente in rats:II. Coeficient of heredity. *Q. J. Stud. Alcohol*, v.14, p.1-2, 1953.
- MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J.; PADOVANI, C.R.; CAGNON, V.H.A.; MARTINEZ, M. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *Prostate*, v.22, p.317-324, 1993.
- MARTINEZ, M.; BRANCO Jr. A.C.; CAGNON, V.H.A.; MELLO Jr. W.; GARCIA, P.J.; MARTINEZ, F.E. Ultrastructural changes on the epithelial cells of uterine tubes os

- Wistar rats after chronic ethanol ingestion. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.31, p.273-278, 1999.
- MELLO, N.K.; BREE, M.P.; MENDELSON ELLINGBOE, J. Alcohol self-administration disrupts reproductive function in female macaque monkeys. **Science**, v.221, p.677-679, 1983.
- MENDELSON, J.A.; MELLO, N.K. Chronic alcohol effects on anterior pituitary and ovarian hormones in the althy women. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.245, p.407-412, 1988.
- MOSKOVIC, S. Effect of chronic alcoholic intoxication on the ovarian dysfunction. **Srp. Arch. Celok. Lek.**, v.103, p.751-759, 1975.
- MORISHITA, T.; NOZAKI, M.; SANO, M.; YOKOYAMA, M.; NAKAMURA, G.; NAKANO, H. Regional differences of phospholipase A₂ activity in the rabbit oviductal epithelium. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.47, p.199-202, 1992.
- MULVIHILL, J.J.; KLIMAS, J.T.; STOKES, D.C.; RISEMBERG, H.M. Fetal alcohol syndrome: seven new cases. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.125, p.937-941, 1976.
- NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. **Biostatistics: the bare essentials**. St. Louis: Mosby Book, 1994. 260p.
- ODOR, D.L.; BLANDAU, R.J. Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. **Fertil. Steril.**, v.24, p.292-300, 1973.
- ODOR, D.L.; GADDUM-ROSSE, P.; RUMERY, R.E.; BLANDAU, R.J. Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*. **Anat. Rec.**, v.198, p.35-37, 1980.
- OLIPHANT, G. Biochemistry and immunology of oviductal fluid. In: SIEGLER, A.M. **The Fallopian tube: basic studies and clinical contributions**. Mount Kisco: Futura, 1986. p.129-145.
- PETRUNKINA, A.M.; SIMON, K.; GUNZEL-APEL, A.R.; TOPFER-PETERSEN, E. Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? **Theriogenology**, v.61, p.1617-1634, 2004.

- POLLARD, J.W.; PLANTE, C.; KING, W.A.; HANSEN, P.J.; BETTERIDGE, K.J.; SUAREZ, S.S. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. **Biol. Reprod.**, v.44, p.102-107, 1991.
- POSCHL, G.; SEITZ, H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol.**, v.39, p.155-165, 2004.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v.71, p.208, 1963.
- SANDOR, S.; GARBAN, Z.; CHECIU, M.; DARADICS, L. The presence of ethanol in the oviductal and uterine luminal fluids of alcoholized rats. **Morphol. Embryol.**, v.27, p.303-309, 1981.
- SMITH, T.T.; KOYANAGI, F.; YANAGIMACHI, R. Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination. **Biol. Reprod.**, v.37, p.225-234, 1987.
- SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. **J. Reprod. Fertil.**, v.86, p.255-261, 1989.
- STROMLAND, K.; PINAZO-DURAN, M.D. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. **Alcohol Alcohol.**, v.37, p.2-8, 2002.
- SUAREZ, S.; REDFERN, K.; RAYNOR, P.; MARTIN, F.; PHILLIPS, D.M. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. **Biol. Reprod.**, v.44, p.998-1004, 1991.
- SUAREZ, S.S. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. **Cells Tissues Organs**, v.168, p.105-112, 2001.
- SUAREZ, S.S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. **Reprod. Domest. Anim.**, v.37, p.140-143, 2002.
- TAL, E.; FONAGY, A.; BERNARD, A.; ENDROCZI, E.; HOCHBERG, A.A. Alcoholic women: inhibition of protein synthesis in the placenta. **Alcohol Alcohol.**, v.20, p.409-410, 1985.
- UCHIYAMA, Y. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. **Arch. Histol. Cytol.**, v.64, p.233-246, 2001.

- URZUA, M.A.; STAMBAUGH, R.; FLICKINGER, G.; MASTROIANNI Jr., L. Uterine and oviduct fluid protein patterns in the rabbit before and after ovulation. **Fertil. Steril.**, v.21, p.860-865, 1970.
- VÄLIMÄKI, M.; YLIKAHRI, R. Alcohol and sex hormones. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.99-105, 1981.
- VAN THIEL, D.H.; GAVALER, J.S.; LESTER, R. Ethanol: a gonadal toxin in the female. **Drug Alcohol Depend.**, v.2, p.373-380, 1977.
- VAN THIEL, D.H.; GAVALER, J.S.; LESTER, R. Alcohol-induced ovarian failure in the rat. **J. Clin. Invest.**, v.61, p.624-632, 1978.
- VERHAGE, H.G.; BRENNER, R.M. Estradiol-induced differentiation of the oviductal epithelium in ovariectomized cats. **Biol. Reprod.**, v.13, p.104-111, 1975.
- WALKER, R.F.; COOPER, R.L.; TIMIRAS, P.S. Constant estrus: role of rostral hypothalamic monoamines in development of reproductive dysfunction in aging rats. **Endocrinology**, v.107, p.249-255, 1980.
- WATSON, M.L. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.4, p.475, 1958.
- WILSNACK, S.C. Sex role identity in female alcoholism. **J. Abnorm. Psychol.**, v.82, p.253-261, 1973.
- WILSNACK, S.C.; KLASSEN, A.D.; WILSNACK, R.W. Drinking and reproductive dysfunction among women in a 1981 national survey. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.8, p.451-458, 1984.
- WOLFE, J.R.; MEANS, L.W.; McMILLEN, B.A. Effects of pregnancy and progesterone on the consumption of ethanol by the high ethanol preferring (HEP) rat. **Alcohol Alcohol.**, v.35, p.344-350, 2000.
- YOUNG, W.C.; BOLING, J.L.; BLANDAU, R.J. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. **Anat. Rec.**, v.80, p.37-45, 1941.

CONCLUSÕES GERAIS

- ◆ O etanol altera a regularidade do ciclo estral da linhagem de ratos UChA e UChB, apesar da morfologia do epitélio da vagina não diferir do grupo controle o que, possivelmente, tem permitido a reprodução dessa linhagem em laboratório;
- ◆ Sugere-se que o etanol induza hiperovulação nas ratas tratadas, observada pelo aumento do número de oócitos na ampola da tuba uterina do grupo UChA para o UChB;
- ◆ O etanol altera a estrutura das células epiteliais (CC e CS) de todas as regiões da tuba uterina; as alterações são dependentes da quantidade de etanol ingerida;
- ◆ Infere-se que o etanol induz, inicialmente, morte celular diferente da apoptose;
- ◆ Infere-se, ainda, que o etanol altera o processo reprodutivo dos ratos UCh.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS*

- ABE, H. Regional variations in the ultrastructural features of secretory cells in the rat oviductal epithelium. *Anat. Rec.*, v.240, p.77-85, 1994.
- ABE, H. Immunocytochemical evidence that a specialized region of the rat oviduct secretes an oviduct specific glycoprotein. *J. Anat.*, v.188, p.333-339, 1996a.
- ABE, H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in citological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol. Histopathol.*, v.11, p.743-768, 1996b.
- ALMEIDA, O.F.X.; SHOAIB, M.; DEICKE, J.; FISCHER, D.; DARWISH, M.H.; PATCHEV, V.K. Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats (The role of the gonadal steroid environment. *J. Clin. Invest.*, v.101, p.2677-2685, 1998.
- ALMEIDA, C.C.D. Ciclo estral, histologia e ultra-estrutura da tuba uterina do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). 2000. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Estrutural) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BADAWY, A.A. Alcohol, aggression and serotonin: metabolic aspects. *Alcohol Alcohol.*, v.33, p.66-72, 1998.
- BAREITHER, M.L.; VERHAGE, H.G. Control of the secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. *Am. J. Anat.*, v.162, p.107-118, 1981.
- BECKER U.; TONNASSEN H.; KAAS-CLAESSON N.; GLUUD C. Menstrual disturbances and fertility in chronic alcoholic women. *Drug Alcohol Depend.*, v.24, p.75-82, 1989.
- BERGMAN, B.; BRISMAR, B. Characteristics of violent alcoholics. *Alcohol Alcohol.*, v.29, p.451-457, 1994.
- BHATT, P.; KADAM, K.; SAXENA, A.; NATRAJ, U. Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. *Indian J. Exp. Biol.*, v.42, p.1043-1055, 2004.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 1997. 240p.

- BO, W.J.; KRUEGER, W.A.; KEVIN, RUDEEN P.; SYMMES, S.K. Ethanol-induced alterations in the morphology and function of the rat ovary. **Anat. Rec.**, v.202, p.255-260, 1982.
- BRENNER, R.M.; SLAYDEN, O.D. Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.) **The physiology of reproduction**. 2 ed. New York: Raven Press, 1994. p.541-569.
- BUHI, W.C.; ALVAREZ, I.M. Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. **Theriogenology**, v.60, p.225-238, 2003.
- BULLÓN, F.; MERCHAN, J.A.; GONZALEZ-GOMEZ, F.; FURIO, V.; POBLETE, E.G. Ultrastructure of the oviductal mucosa of the rat. III. Basal and peg cells. **J. Fertil.**, v.25, p.293-297, 1980.
- CARLSSON, B.; HILLENSJO, T.; NILSSON, A.; TORNELL, J.; BILLIG, H. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the rat Fallopian tube: possible autocrine and paracrine action of Fallopian tube-derived IGF-I on the Fallopian tube and on the preimplantation embryos. **Endocrinology**, v.133, p.2031-2039, 1993.
- CARRARA, O.; OGER-JEANNIN, V.; DESECHALLIERS, J.P. Disorders of the hypothalamo-hypophyseal-ovarian axis in chronic alcoholic women. **Rev. Med. Interne**, v.14, p.9-13, 1993.
- CEBRAL, E.; LASSERRE, A.; RETTORI, V.; DE GIMENO, M.A. Alterations in preimplantation in vivo development after preconceptional chronic moderate alcohol consumption in female mice. **Alcohol Alcohol**, v.35, p.336-343, 2000.
- CHANG, G.; BEHR, H.; GOETZ, M.A.; HILEY, A.; BIGBY, J. Women and alcohol abuse in primary care. Identification and intervention. **Am. J. Addict.**, v.6, p.183-192, 1997.
- CRABBE, J.C. Genetic models of alcohol dependence. **Alcohol Alcohol**, suppl.1, p.103-108, 1987.
- CROW, J.; AMSO, N.N.; LEWIN, J.; SHAW, R.W. Morphology and ultrastructure of Fallopian tube epithelium at different stages of the menstrual cycle and menopause. **Hum. Reprod.**, v.9, p.2224-2233, 1994.

- CUNNINGHAM, R.M.; MAIO, R.F.; HILL, E.M.; ZINK, B.J. The effects of alcohol on head injury in the motor vehicle crash victim. **Alcohol Alcohol.**, v.37, p.236-240, 2002.
- DE WITTE, P. The role of neurotransmitters in alcohol dependence: animal research. **Alcohol Alcohol.**, v.31, suppl.1, p.13-16, 1996.
- EHRIG, T.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. Alcohol and aldehyde dehydrogenase. **Alcohol Alcohol.**, v.25, p.105-116, 1990.
- ELLINGTON, J.E.; BALL, B.A.; YANG, X. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.203-208, 1993a.
- ELLINGTON, J.E.; BALL, B.A.; BLUE, B.J.; WILKER, C.E. Capacitation-like membrane changes and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.1505-1510, 1993b.
- ERIKSEN, T.; TERKELSEN, O.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. **Anat. Embryol.**, v.190, p.583-590, 1994.
- ERIKSSON, C.J.; FUKUNAGA, T.; SARKOLA, T.; LINDHOLM, H.; AHOLA, L. Estrogen-related acetaldehyde elevation in women during alcohol intoxication. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.20, p.1192-1195, 1996.
- FOROUD, T.; TING-KAI, L. Genetics of alcoholism: a review of recent studies in human and animal models. **Am. J. Addict.**, v.8, p.261-278, 1999.
- GLENN, S.W. Sex differences in alcohol-induced brain damage. In: HUNT, W.A.; NIXON, S.J. (Eds.) **Alcohol-induced brain damage**. Washington: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 1993. p.195-212. (NIAAA Research Monograph, 22).
- GUERRI, C. Synaptic membrane alterations in rats exposed to alcohol. **Alcohol Alcohol.**, suppl.1, p.467-472, 1987.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.
- HALBREICH, U.; PALTER, S. Accelerated osteoporosis in psychiatric patients: possible pathophysiological processes. **Schizophr. Bull.**, v.22, p.447-454, 1996.

- HAMID, A.; HADI, J.A.; CASTILLO, R.A. Alcohol on reproductive function: a review. **Obstet. Gynecol.**, v.42, p.69-74, 1987.
- HARPER, C.G.; SMITH, N.A.; KRILL, J.J. The effects of alcohol on the female brain: a neuropathological study. **Alcoholism**, v.25, p. 445-448, 1990.
- HAYUMPA, A.M. Mechanisms of vitamin deficiencies in alcoholism. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.10, p.573, 1986.
- HOAKEN, P.N.; PIHL, R.O. The effects of alcohol intoxication on aggressive responses in men and women. **Alcohol Alcohol.**, v.35, p.471-477, 2000.
- HOCHGRAF, P.B.; ZILBERMAN, M.L.; DE ANDRADE, A. Women alcoholics – social, demographic and clinical characteristics in a Brazilian sample. **Alcohol Alcohol.**, v.30, p.427-432, 1995.
- HOLLIS, D.E.; FRITH, P.A.; VAUGHAN, J.D.; CHAPMAN, R.E.; NANCARROW, C.D. Ultrastructural changes in the oviductal epithelium of merino ewes during the estrous cycle. **Am. J. Anat.**, v.171, p.441-456, 1984.
- JANKALA, H.; ERIKSSON, C.J.; EKLUND, K.K.; HARKONEN, M.; MAKI, T. Combined calcium carbimide and ethanol treatment induces high blood acetaldehyde levels, myocardial apoptosis and altered expression of apoptosis-regulating genes in rat. **Alcohol Alcohol.**, v.37, p.222-228, 2002.
- JOHANSSON, B.A.; BERGLUND, M.; HANSON, M.; POHLEN, C.; PERSSON, I. Dependence on legal psychotropic drugs among alcoholics. **Alcohol Alcohol.**, v.38, p.613-618, 2003.
- KAUFMAN, M.H. The teratogenic effects of alcohol following exposure during pregnancy, and its influence on the chromosome constitution of the pre-ovulatory egg. **Alcohol Alcohol.**, v.32, p.113-128, 1997.
- KESMODEL, U.; WISBORG, K.; OLSEN, S.F.; HENRIKSEN, T.B.; SECHER, N.J. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. **Alcohol Alcohol.**, v.37, p.87-92, 2002.
- KILLIAN, G.J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.141-153, 2004.

- KREBS, H.A.; FREEDLAND, R.A.; HEMS, R.; STUBBS, M. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. **Biochem. J.**, v.112, p.117, 1969.
- KUBICKA, L.; CSEMY, L.; KOZENY, J.; NESPOR, K. The substance specificity of psychosocial correlates of alcohol, tobacco, coffee and drug use by Czech women. **Addiction**, v.88, p.813-820, 1993.
- LAPOINTE, J.; BILODEAU, J.F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.68, p.1157-1164, 2003.
- LAURA, I.A.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Ultrastructural and morphometric analysis on the ovary of Wistar rats after chronic ethanol ingestion. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.35, p.167-176, 2003.
- LEESE, H.J. The formation and function of oviduct fluid. **J. Reprod. Fertil.**, v.82, p.843-856, 1988.
- LEESE, H.J.; TAY, J.I.; REISCHL, J.; DOWNING, S. Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. **Reproduction**, v.121, p.339-346, 2001.
- LES DEES, W.; SKELLEY, C.W. Effects of ethanol during the onset of female puberty. **Neuroendocrinology**, v.51, p.64-69, 1990.
- LIEBER, C.S. Alcohol, liver and nutrition. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.10, p.602, 1991.
- LIEBER, C.S. Medical disorders of alcoholism. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. **N. Engl. J. Med.**, v.333, p.1058, 1995.
- LIU, J.J.; WANG, J.Y.; HERTEVIG, E.; CHENG, Y.; NILSSON, A.; DUAN, R.D. Activation of neutral sphingomyelinase participates in ethanol-induced apoptosis in Hep G2 cells. **Alcohol Alcohol.**, v.35, p.569-573, 2000.
- LOBB, M.O. The role of alcohol in unplanned pregnancy. **Alcohol Alcohol.**, v.19, p.151-152, 1984.
- MARDONES, J.; SEGOVIA, N.; HEDERRA, A. Heredity of alcohol preferente in rats:II. Coeficient of heredity. **Q. J. Stud. Alcohol**, v.14, p.1-2, 1953.
- MARTINEZ, M.; BRANCO Jr. A.C.; CAGNON, V.H.A.; MELLO Jr. W.; GARCIA, P.J.; MARTINEZ, F.E. Ultrastructural changes on the epithelial cells of uterine tubes os Wistar rats after chronic ethanol ingestion. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.31, p.273-278, 1999.

- MAYES, P.A. Transporte e armazenamento de lipídeos. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.254-270.
- MAYOU, R.; BRYANT, B. Alcohol and road traffic accidents. **Alcohol Alcohol.**, v.30, p.709-711, 1995.
- McLEOD, D.R.; FOSTER, G.V.; HOEHN-SARIC, R.; SVIKIS, D.S.; HIPSLEY, P.A. Family history of alcoholism in women with generalized anxiety disorder who have premenstrual syndrome: patient reports of premenstrual alcohol consumption and symptoms of anxiety. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.18, p.664-670, 1994.
- MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H.; TEOH, S.K. Neuroendocrine consequences of alcohol abuse in women. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.562, p.211-240, 1989.
- MELLO, N.K.; MENDELSON, J.H.; DRIEZE, J.; KELLY, M. Effects of alcohol on E2 beta-stimulated luteinizing hormone in ovariectomized rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v.7, p.305-316, 1992.
- MISRA, P.S.; LEFEVRE, A.; ISHII, H.; RUBIN, E.; LIBER, C.S. Increase of ethanol, meprobamate and pentobarbital metabolism after chronic ethanol administration in man and in rats. **Am. J. Med.**, v.51, p.346, 1971.
- MONCRIEFF, J.; FARMER, R. Sexual abuse and the subsequent development of alcohol problems. **Alcohol Alcohol.**, v.33, p.592-601, 1998.
- MORISHITA, T.; NOZAKI, M.; SANO, M.; YOKOYAMA, M.; NAKAMURA, G.; NAKANO, H. Regional differences of phospholipase A₂ activity in the rabbit oviductal epithelium. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.47, p.199-202, 1992.
- MOSELHY, H.F.; GEORGIU, G.; KAHN, A. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. **Alcohol Alcohol.**, v.36, p.357-368, 2001.
- MURRAY, R.K. Histórias de casos bioquímicos. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.814-828.

- NELLOR, J.E. The leucocyte-like cells of the oviducts during the normal estrous cycle and their modification by progestin and estrogen treatment. **Anat. Rec.**, v.151, p.171-181, 1965.
- NILSSON, O.; REINIUS, S. Light and electron microscopic structural of the oviduct. In: HAFEZ, E.S.E.; BLANDAU, R.J. **The mammalian oviduct**. Chicago: The University of Chicago Press, 1969. p.57-84.
- NORTON, R.; DWYER, T.; MacMAHON, S. Alcohol consumption and the risk of alcohol related cirrhosis in women. **Br. Med. J.**, v.295, p.80-82, 1987.
- ODELEYE, O.E.; ESKELSON, C.D.; WATSON, R.R.; LOPEZ, M.C.; WATZL, B. Effects of prolonged ethanol consumption on hepatic lipids and hepatotoxicity in C57BL/6 female mice. **Alcohol Alcohol.**, v.26, p.585-595, 1991.
- ODOR, D.L. The question of "basal" cells in oviductal and endocervical epithelium. **Fertil. Steril.**, v.25, p.1047-1062, 1974.
- ODOR, D.L. Migratory cells and large heterogeneous dense bodies in the oviductal epithelium of primates. **Anat. Rec.**, v.204, p.402, 1982.
- ODOR, D.L.; BLANDAU, R.J. Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. **Fertil. Steril.**, v.24, p.292-300, 1973.
- ODOR, D.L.; GADDUM-ROSSE, P.; RUMERY, R.E. Secretory cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*, during the menstrual cycle and after estrogen treatment. **Am. J. Anat.**, v.166, p.149-72, 1983.
- OLIPHANT, G. Biochemistry and immunology of oviductal fluid. In: SIEGLER, A.M. **The Fallopian tube: basic studies and clinical contributions**. Mount Kisco: Futura, 1986. p.129-145.
- PEARSE, A.G.E. Carbohydrates and mucosubstances. In: PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill Livingstone, 1968. v.1, p.295-380.
- PETTERSSON, P.; ELLSINGER, B.M.; SJOBERG, C.; BJORNTORP, P. Fat distribution and steroid hormones in women with alcohol abuse. **J. Intern. Med.**, v.228, p.311-316, 1990.

- PIHL, R.O.; LeMARQUAND, D. Serotonin and aggression and the alcohol-aggression relationship. **Alcohol Alcohol.**, v.33, p.55-65, 1998.
- PIRKOLA, S.P.; ISOMETSA, E.T.; HEIKKINEN, M.E.; LONNQVIST, J.K. Suicides of alcohol misusers and non-misusers in a nationwide population. **Alcohol Alcohol.**, v.35, p.70-75, 2000.
- PRIOR, P. Long-term cancer risk in alcoholism. **Alcohol Alcohol.**, v.23, p.163-171, 1988.
- POSCHL, G.; SEITZ, H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol.**, v.39, p.155-165, 2004.
- ROMAN, P.M. Biological features of women's alcohol use: a review. **Public Health Rep.**, v.103, p.628-637, 1988.
- ROSS, R.K.; BERNSTEIN, L.; TRENT, L.; HENDERSON, B.E.; PAGANINI-HILL, A. A prospective study of risk factors for traumatic deaths in a retirement community. **Prev. Med.**, v.19, p.323-334, 1990.
- SCHUMANN, G.; SPANAGEL, R.; MANN, K. Candidate genes for alcohol dependence: animal studies. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.27, p.880-888, 2003.
- SECRETARIA EXECUTIVA DE SAÚDE PÚBLICA – SESPA. **Situação de Saúde_.** **Saúde Mental.** Pará. 2005. Disponível em: <<http://www.sespa.pa.gov.br/>>. Acesso em: 21 fev. 2005.
- SEITZ, H.K.; CZYGAN, P.; SIMANOWSKI, U.; WALDHERR, R.; VEITH, S.; RAEDSCH, R.; KOMMERELL, B. Stimulation of chemically induced rectal carcinogenesis by chronic ethanol ingestion. **Alcohol Alcohol.**, v.20, p.427-433, 1985.
- SERVICE, F.J. Hypoglycemia. **Med. Clin. North Am.**, v.79, p.1, 1995.
- STROMLAND, K.; PINAZO-DURAN, M.D. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. **Alcohol Alcohol.**, v.37, p.2-8, 2002.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; CONTRERAS, S.; SEGOVIA-REQUELME, N.; MARDONES, J. Biological similarities and differences between rats genetically different in alcohol preference. **Alcohol Alcohol.**, v.19, p.203-209, 1984.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; MARDONES, J. Acetaldehyde metabolism: differences between UChA and UChB rats. **Alcohol Alcohol.**, v.29, p.751-755, 1994.

- TATE, D.L.; CHARETTE, L. Personality, alcohol consumption, and menstrual distress in young women. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.15, p.647-652, 1991.
- TEOH, S.K.; LEX, B.W.; MENDELSON, J.H.; MELLO, N.K.; COCHIN, J. Hyperprolactinemia and macrocytosis in women with alcohol and polysubstance dependence. **J. Stud. Alcohol.**, v.53, p.176-182, 1992.
- THOMSEN, J.L.; FROHLICH, B. Drug abuse and intoxication in alcoholics. **Alcohol Alcohol.**, v.30, p.379-383, 1995.
- VAN THIEL, D.H.; GAVALER, J.S.; LESTER, R. Ethanol: a gonadal toxin in the female. **Drug Alcohol Depend.**, v.2, p.373-80, 1977.
- VALIMAKI, M.J.; LAITINEN, K.; TIITINEN, A.; STEMAN, U.H.; YLOSTALO, P. Gonadal function and morphology in non-cirrhotic female alcoholics: a controlled study with hormone measurements and ultrasonography. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.74, p.462-466, 1995.
- WAERN, M. Alcohol dependence and misuse in elderly suicides. **Alcohol Alcohol.**, v.38, p.249-254, 2003.
- WILSNACK, S.C.; KLASSEN, A.D.; WILSNACK, R.W. Drinking and reproductive dysfunction among women in a 1981 national survey. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.8, p.451-458, 1984.
- WOLFE, J.R.; MEANS, L.W.; McMILLEN, B.A. Effects of pregnancy and progesterone on the consumption of ethanol by the high ethanol preferring (HEP) rat. **Alcohol Alcohol.**, v.35, p.344-350, 2000.
- YOSHIDA, A. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes related to alcohol sensitivity and alcoholic diseases. **Alcohol Alcohol.**, v.9, p.693-696, 1994.