

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

WAGNER JOSÉ FÁVARO

**REATIVIDADE HORMONAL E ULTRA-ESTRUTURA DO
LOBO VENTRAL DA PRÓSTATA DE RATOS (*Rattus
norvegicus*) SUBMETIDOS AO USO CRÔNICO
SIMULTÂNEO DE ETANOL E NICOTINA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F277r Fávoro, Wagner José
Reatividade hormonal e ultra-estrutura do lobo ventral da próstata de ratos (*Rattus norvegicus*) submetidos ao uso crônico simultâneo de etanol e nicotina / Wagner José Fávoro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Alcoolismo. 2. Próstata. 3. Ultraestrutura (Biologia). 4. Nicotina. 5. Testosterona. I. Quitete, Valéria Helena Alves Cagnon. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Hormonal and ultrastructural reactivity of the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to simultaneous long-term alcohol-nicotine treatment.

Palavras-chave em inglês: Alcoholism; Prostate; Ultrastructure (Biology); Nicotine; Testosterone.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, José Ângelo Camili, Camila Contin Diniz de Almeida França.

Data da defesa: 05/06/2006.

Campinas, 05 de junho de 2006.

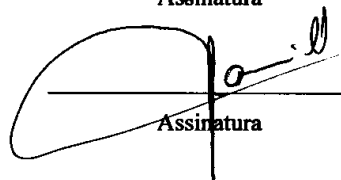
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. José Ângelo Camilli



Assinatura

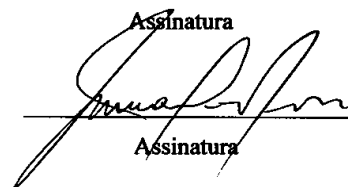
Profa. Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Assinatura

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

Assinatura

Prof. Dr. Marco César Somazz



Assinatura

DEDICATÓRIA
A DEUS...

“O Senhor é meu rochedo, minha fortaleza e meu libertador.

Meu Deus é minha rocha, onde encontro o meu refúgio,

Meu escudo, força de minha salvação e minha cidadela” (Salmo 31:2-4)

AOS AMORES DE MINHA VIDA

MEUS PAIS, ADILSON E CARMEN,

“A minha gratidão pela educação que me proporcionaram, e por termos percorridos juntos mais uma parte do longo caminho de minhas conquistas. Pelo amor único e infinito; fraterno, amigo e confidente que sempre zela e se oferece por inteiro.”

AOS MEUS IRMÃOS, MARCO E PATRÍCIA,

“Pelo exemplo, compreensão e incentivo. Esta conquista é de todos nós.”

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, orientadora e amiga sempre, que com disponibilidade, bravura e capacidade soube me conduzir no caminho de crescimento intelectual. Minha eterna gratidão. Que o Grande Arquiteto do Universo ilumine sempre seu caminho e de sua família.

Aos Mestres **Profa. Dra. Maria Júlia Marques**, **Prof. Dr. Humberto Santo Neto** e **Prof. Dr. José Ângelo Camilli**, por guiarem meu início e incentivo constante. Muito obrigado.

Aos Mestres do Departamento de Anatomia, pela oportunidade e pela sempre gentil ajuda **Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos**, **Prof. Dr. Marcos César Somazz** e **Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira**. Muito obrigado.

À todos do **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural**.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, pelo auxílio na execução da análise estatística.

À **Profa. Dra. Elaine Minatel**, à **Profa. Dra. Ivanira José Bechara** e ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto** pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. José Ângelo Camilli**, ao **Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada**, à **Profa. Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia**, ao **Prof. Dr. Marco César Sommaz**, pela indicação dos nomes, pelas correções e lapidação deste trabalho, durante a pré-banca examinadora.

À **Sra. Ana Floriano Rodrigues**, pela atenção que me dispensou durante todo o período no Departamento de Anatomia.

Em especial a **Sra. Lilian Alves Senne Panagio**, sempre presente, amiga e que com grande maestria dispensou-me atenção durante todo o Mestrado.

Aos **Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula**, pela disposição em ajudar durante a parte experimental deste trabalho.

À **Sra. Marlene Lima Francisco**, pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

Aos **Srs. Paulo Afonso Bernardes, Carlos Roberto Gonçalves, Paulo Francisco dos Santos e Toni Donizeti dos Santos**, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação**, por ensinarem um pouco mais sobre a convivência em grupo.

À **CAPES** e **Faep/Unicamp** pelos auxílios, o que tornou possível à execução e finalização deste trabalho.

“A verdadeira sabedoria é irmã da simplicidade e se adquire muito mais pelas obras do que pelos livros.”

(São Francisco de Assis)

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
I-INTRODUÇÃO.....	01
II-OBJETIVOS.....	10
III-MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
III.1-Macroscopia.....	11
III.2-Microscopia de Luz.....	12
III.3- Microscopia Eletrônica.....	12
III.4- Morfometria em Nível de Microscopia de Luz.....	13
III.5- Dosagens dos Níveis de Testosterona e Estrógenos Totais no Plasma Sanguíneo.....	14
III.6- Imunolocalização dos Receptores Androgênicos e Estrogênicos α	14
III.7- Análises Estatísticas.....	15
IV-ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	16
IV.1- “Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment”.....	17
IV.2- “Expressão dos Receptores Androgênicos e Estrogênicos α na Próstata Ventral de Ratos Submetidos ao Tratamento Crônico Simultâneo de Etanol e Nicotina”.....	50
V- CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS.....	70
VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

RESUMO

O álcool e a nicotina têm ação prejudicial sobre o funcionamento da glândula prostática. Contudo, os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nas alterações prostáticas, bem como suas correlações com a patogênese glandular permanecem desconhecidos. Assim, os objetivos do presente estudo foram caracterizar as alterações estruturais das células epiteliais e do estroma e, a expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos α na próstata ventral de ratos sob o efeito da ação concomitante de nicotina e etanol, bem como cada uma dessas drogas isoladamente, além dos níveis plasmáticos dos hormônios testosterona e estrógenos. Também, foi objetivo estabelecer associações das interações epitélio-estromal frente a possível patogênese glandular. Um total de 40 ratos macho (*Rattus norvegicus*), com 75 dias de idade, foi dividido em quatro grupos: Grupo controle (10 animais) recebeu água *ad libitum*; Grupo alcoolista (10 animais) recebeu etanol diluído a 10% *Gay Lussac* (10% v/v) *ad libitum*; Grupo nicotina (10 animais) recebeu um total de 0,125mg/100g de peso corpóreo/diariamente de nicotina (Sigma, St. Louis, USA) por via subcutânea; Grupo nicotina-álcool (10 animais) recebeu tratamento simultâneo com etanol e nicotina, nas mesmas concentrações que nos grupos alcoolista e nicotina. Após 90 dias de tratamento, todos os animais foram sacrificados e amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas para análises macroscópicas, microscopias de luz e eletrônica de transmissão e imunomarcações dos receptores androgênicos e estrogênicos α , além das dosagens hormonais. Os resultados revelaram: atrofia dos órgãos genitais masculinos como testículos e vesículas seminais; atrofia epitelial; neoplasia intra-epitelial prostática; desorganização das organelas envolvidas no processo secretor; hipertrofia estromal; presença de microócinos e células inflamatórias e célula muscular lisa com fenótipo secretor. Também, houve diminuição significativa dos níveis séricos de testosterona e aumento dos níveis séricos de estrógenos nos animais dos grupos nicotina-álcool, alcoolista e nicotina em relação aos animais controles, bem como a expressão dos seus respectivos receptores. Assim, concluiu-se que fatores extrínsecos como etanol e

nicotina são componentes de risco à homeostase da glândula prostática, levando a ocorrência da patogênese do órgão, a qual poderá ser associada à processos tardios de malignescência glandular.

ABSTRACT

Alcohol and nicotine act negatively on the prostatic gland function. However, molecular and cellular mechanisms involved in the prostatic alteration, as well as their correlations with glandular pathogenesis remain unclear. Then, the main objective of this study was to identify the features of the epithelial and stromal prostatic structure and to characterize the expression of the androgenic and α estrogenic receptors in rats submitted to chronic nicotine and alcohol use simultaneously, besides each one of these drugs alone. Moreover, it was intended to establish the stromal-epithelial interaction in a possible glandular pathogenesis. A total of 40 male rats, aged 75 days, were divided into 4 groups: Control group (10 animals) received tap water *ad libitum*; Alcoholic group (10 animals) received diluted 10% *Gay Lussac* ethanol *ad libitum*; Nicotine group (10 animals) received a 0.125 mg/100 g body weight dose of nicotine daily; Nicotine-Alcohol group (10 animals) received simultaneous alcohol and nicotine treatment, in the same concentration as the alcoholic and nicotine groups. After 90 days of treatment, the animals were sacrificed and samples from the ventral lobe of the prostate were collected and processed for transmission electron and light microscopies, immunological techniques to androgenic and α estrogenic receptor expression and radioimmunoassay techniques to measure testosterone and estrogen levels. The results showed atrophied testes and seminal vesicle, atrophied prostatic epithelial cells, prostatic intraepithelial neoplasm, disorganization of cellular organelles involved in the glandular process, inflammatory cells, diminished testosterone levels and their receptors besides increased estrogen levels. All alterations were verified in the different experimental groups, being more intense in the alcohol-nicotine, alcoholic and nicotine groups, respectively. Then, it can be concluded that extrinsic factors like ethanol and nicotine are risk compounds to prostatic homeostasis, leading to occurrence of glandular pathogenesis which could be related to glandular malignancy late.

I-INTRODUÇÃO

ALCOOLISMO

O alcoolismo é uma doença de extensão mundial, sendo um dos freqüentes diagnósticos encontrados em casos clínicos (Chaieb & Castellarin, 1998; Ministério da Saúde, 2005). No Brasil, sabe-se que cerca de 15% da população é alcoolista e aproximadamente 90% das internações em hospitais psiquiátricos por dependência a drogas acontecem devido ao álcool (Ministério da Saúde, 2005). Hoje, o Brasil gasta anualmente 7,3% do Produto Interno Bruto (PIB) no tratamento de patologias decorrentes do alcoolismo que variam desde a reabilitação de um dependente até a recuperação da produtividade do trabalho desses indivíduos (Ministério da Saúde, 2005).

O alcoolismo é classificado como uma doença progressiva e fatal, sendo que o termo “desordem” é utilizado para o grupo de sintomas e comportamentos que usualmente acompanham o alcoolismo (CID-10, 1992). Segundo Madden (1992), o alcoolismo só pode ser reconhecido como doença quando três ou mais dos seguintes aspectos forem observados: forte desejo pela substância; perda de controle no que diz respeito ao consumo, à quantidade e cessação do hábito; síndrome de abstinência; tolerância; progressiva perda de outros prazeres e hábitos; continuação do hábito apesar do desenvolvimento evidente de outros males.

O álcool (etanol, metanol e n-propanol) é absorvido rapidamente no estômago, intestinos delgado e grosso, nos pulmões (vapor de álcool), na bexiga urinária, cavidades peritonal e pleural. Sua distribuição ocorre através de difusão rápida e uniforme por capilares e membranas para atingir todos os tecidos e líquidos extracelulares do organismo (Kalant, 1983). A excreção corpórea do álcool é dada pela soma das taxas de eliminação através da urina, da respiração e do suor, o que representa cinco por cento do total a ser eliminado. A principal via excretora ocorre no fígado através das ações de enzimas oxidativas: álcool dihidrogenase, a catalase e o sistema de oxidações metabólicas microsossomais (Kalant, 1983).

O álcool e seus metabólitos provocam distúrbios generalizados, especialmente, nos sistemas nervoso central, genital masculino e órgãos hematopoiéticos. Atua também, diretamente no fígado, pâncreas, intestinos e glândulas endócrinas (Marks & Wright, 1978).

O uso de roedores em estudos experimentais sobre alcoolismo, com dosagens que variam de 5% a 40% tem elucidado muitos aspectos biológicos e bioquímicos relacionados à essa doença. Estes estudos têm duração de dias ou semanas no alcoolismo agudo e meses no alcoolismo crônico (Cícero & Badger, 1977; Banderas et al., 1992).

No sistema genital uma das principais conseqüências do alcoolismo é o hipogonadismo que ocorre tanto no homem como em animais de laboratório (Bannister & Lowosky, 1987). Alguns autores acreditavam que essa disfunção sexual estava relacionada à doença crônica do fígado (Van Thiel et al., 1974; Van Thiel & Lester, 1979). Posteriormente, caracterizou-se que a disfunção hepática não está associada à debilitação da função reprodutora (Anderson et al., 1989). Entretanto, as alterações relativas ao sistema genital são exacerbadas em indivíduos com cirrose alcoólica (Wang et al., 1999). Assim, é conhecido que o etanol atua como uma toxina direta sobre as gônadas masculinas, alterando a síntese de testosterona testicular (Banister & Lowosky, 1987; Anderson et al., 1989; Saxena et al., 1990; Tadic et al., 2000) e indireta, provocando efeitos deletérios sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, com conseqüente redução na produção de andrógenos pelas células de Leydig (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Tadic et al., 2000). Em decorrência da privação androgênica pelo alcoolismo crônico, diversas alterações morfológicas nocivas afetam o sistema genital masculino (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Kiess & Gallaher, 1998; Tadic et al., 2000). Essas alterações incluem lesões das células testiculares, diminuição dos diâmetros dos túbulos seminíferos, depressão no nível de testosterona sérica, redução do peso das glândulas sexuais acessórias, diminuição significativa nas alturas das células dos epitélios secretores das vesículas seminais, próstatas ventral, lateral e dorsal, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático granular e do complexo de Golgi, ruptura dos microvilos e acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma das células epiteliais (Martinez et al., 1993; Cagnon et al., 1996; Martinez et al., 1997; Cagnon et al., 1998; Garcia et al. 1999; Cagnon et al., 2001; Sáttolo et al., 2004). Além disso, ocorre perda de função em termos de atividade proliferativa e secretora, síntese de DNA, conteúdo e

complexidade do RNA e, diminuição na quantidade de receptores androgênicos (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Kiess & Gallaher, 1998; Tadic et al., 2000). Na próstata ventral de roedores acredita-se tanto no efeito direto como no indireto do etanol sobre o epitélio glandular (Martinez et. al, 1993; Sáttolo et al., 2004).

TABAGISMO

O tabagismo é a principal causa de morte evitável em todo o mundo. Estima-se que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas, sejam fumantes, sendo que nos países mais desenvolvidos 42% são homens e 24% mulheres (Hebert, 2000; Ministério da Saúde/ INCA, 2005). O total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu 4,9 milhões de mortes anuais, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia. Assim, acompanhando as tendências do tabagismo, projeta-se 10 milhões de mortes anuais para o ano de 2030, sendo metade delas em indivíduos em idade produtiva (Ministério da Saúde/ INCA, 2005). As doenças mais encontradas como causadoras diretas de mortes nos fumantes são: bronquite, enfisema pulmonar, câncer de pulmão, doenças coronarianas, cânceres de língua, da laringe, do esôfago, da bexiga urinária e do pâncreas. O câncer de próstata também parece ter correlação positiva com o consumo de tabaco, especialmente, considerando-se a alteração do metabolismo dos hormônios sexuais já demonstrada em indivíduos fumantes (Hsing et. al, 1991; Van der Gulden et. al, 1994).

Do tabaco do cigarro podem-se isolar mais de 4.700 substâncias, sendo 95% da chamada fase condensada e os outros 5% da fase gasosa (Rosemberg, 1981). Na fase condensada os compostos mais conhecidos são: a nicotina, os fenóis, os cresóis, os hidrocarbonetos aromáticos, o benzopireno, o criseno, os aldeídos, as cetonas e os álcoois. Já na fase gasosa têm-se o nitrogênio, o oxigênio, o dióxido de carbono, o monóxido de carbono, o hidrogênio, o argônio e o vapor de água (Rosemberg, 1981). A nicotina é o maior alcalóide do tabaco sendo considerada seu componente primário e responsável pelos principais efeitos prejudiciais nos fumantes (Chinoy & Seethakhsmi, 1978; Rosemberg, 1981; Chowdhury & Bromage, 2000). Além da tabaco-dependência, a nicotina também altera a homeostase dos diferentes sistemas orgânicos como: cardiovascular, nervoso, endócrino e genital (Meade et al.,1987; Mjos, 1988; Zhu & Parmley, 1997; Marano, et al.,

1999; Florek and Marszalek, 1999). A nicotina é solúvel em água e lipídeos tendo como resultado a rápida distribuição através de todos os tecidos e fluídos corpóreos (Abel, 1983).

Diferentes pesquisadores tem demonstrado, tanto em estudos experimentais como clínicos, os efeitos prejudiciais da nicotina sobre o sistema genital masculino (Sterling & Kobayashi, 1975; Vogt et. al, 1984). Evidências epidemiológicas caracterizaram que fumantes crônicos apresentam taxa elevada no desenvolvimento de impotência sexual, devido a lesões no endotélio vascular e no sistema nervoso periférico, além de decréscimo no número de espermatozóides (Weisberg, 1985; Mannino et. al, 1994; Xie et. al, 1997). Estudos experimentais com administração de nicotina em cachorros, coelhos, cobaias, ratos e camundongos mostraram atrofia testicular com degradação celular (Kleiber et. al, 1984; Mannino et. al, 1994; Xie et. al, 1997). Londonkar et. al (1998) estudaram ratos adultos frente à administração de nicotina e revelaram acentuada diminuição no peso dos epidídimos, vasos deferentes e atrofia celular em ambos os órgãos. Também, Reddy et al. (1998) após a injeção de doses gradativas de nicotina em camundongos observaram redução nos pesos dos testículos e acúmulo de gotas lipídicas nas células desse órgão. Nas glândulas sexuais acessórias desses animais, os autores verificaram acentuado decréscimo no peso fresco sendo esse atribuído à escassez aguda de andrógenos. Segundo Meikle et. al (1998) a nicotina e o seu principal metabólito, a cotinina são inibidores competitivos da enzima 3α -hidroxiesteróide dihidrogenase importante no metabolismo da dihidrotestosterona, destacando a ação nociva do cigarro de tabaco no mecanismo de ação androgênica.

ASSOCIAÇÃO: ÁLCOOL E NICOTINA

O uso simultâneo de bebidas alcoólicas e cigarro de tabaco têm sido evidenciado em diferentes estudos, sendo a incidência de alcoolismo 10 vezes mais freqüente em indivíduos fumantes (DiFranza & Guerrero, 1990; Blomqvist et al., 1996). Experimentalmente, sugeriu-se que o álcool exerce estímulo inespecífico em várias áreas comportamentais, levando ao aumento do consumo de cigarros de tabaco (Griffiths et al., 1976; Mello, 1980; Batel et al., 1995; Toneatto et al., 1995).

O uso concomitante de álcool e nicotina tem mostrado drásticas alterações em diferentes sistemas orgânicos como: sistema respiratório, digestório, urogenital (Kozlowski et al., 1993; Noble et al., 1994; Reed et al., 1994; Chaieb & Castellarin, 1998; Ellingstad et al., 1999). No sistema genital masculino observou-se que usuários de nicotina e álcool sofrem de impotência, perda da libido, ejaculação precoce e infertilidade (Dhawan & Sharma, 2002). Também, foi demonstrado declínio dos níveis de testosterona com conseqüente diminuição da maturação dos espermatozóides, além do aumento do risco de dispermia tanto clínica como experimentalmente (Tentler et al., 1997; Srikanth et al., 1999). Outros estudos evidenciaram através de amostragem de sêmen de usuários crônicos de álcool e nicotina espermatozóides com alterações morfológicas e baixa motilidade (Tentler et al., 1997; Srikanth et al., 1999).

MORFOFISIOLOGIA DA PRÓSTATA

A próstata é uma glândula sexual acessória do sistema genital masculino, hormônio-dependente, sendo considerada a glândula mais volumosa e de maior expressividade funcional desse sistema (Cunha et al., 2002; Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005). Na espécie humana, encontra-se localizada ao redor da uretra, inferiormente à bexiga urinária, e são descritas três regiões glandulares: zona periférica, zona central e região pré-prostática, envoltas por uma fina camada fibromuscular (Setchell & Brooks, 1988).

A secreção prostática apresenta propriedades importantes para que a fertilização tenha êxito, pois neutraliza o meio e contribui sobremaneira para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozóides (Blandy & Lytton, 1986; Lin & Bissel, 1993). Os constituintes da secreção prostática envolvem ácido cítrico, ácido siálico, espermina e prostaglandinas, enzimas como amilase, fibrinogenase, aminopeptidase, transglutaminase, fosfatases ácida e alcalina, uma cascata de fibrinolisinases e zinco (Blandy & Lytton, 1986; Lin & Bissel, 1993; Bull et al., 2001).

Em roedores, a glândula prostática se apresenta como uma estrutura complexa composta de três pares de lobos distintos, designados pela localização que cada um deles ocupa em relação à uretra (Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986; Aumuller & Seitz, 1990). Assim, são identificados os lobos ventrais, laterais e dorsais e um par de glândulas

coaguladoras ou próstata anterior localizada na face côncava das vesículas seminais (Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986; Aumuller & Seitz, 1990).

O epitélio prostático é composto por células cilíndricas altas, com citoplasma apresentando complexo de Golgi, retículo endoplasmático granular, grânulos de secreção e mitocôndrias. Além de produzirem a secreção, essas células também podem armazená-la devido ao extenso plegueamento do epitélio secretor (McNeal et al., 1988; Abate-Shen & Shen, 2000; Garraway et al., 2003). Também, entremeadas às células epiteliais secretoras evidenciam-se células menores, achatadas ou arredondadas chamadas de células epiteliais basais (Jesik et al., 1982; Garraway et al., 2003).

A membrana basal está localizada entre o epitélio e o estroma, tendo seus principais componentes o colágeno tipo IV e a laminina (Knox et al., 1994).

O estroma prostático é formado por um arranjo complexo de células estromais e matriz extracelular associado a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, as quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Tuxhorn et al., 2001; Cunha & Matrisian, 2002). Também, vasos sangüíneos, terminações nervosas e macrófagos fixos constituem partes integrais do estroma (Prins et al., 1991; Tuxhorn, et al., 2001). Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático, sendo que a principal função destes é sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular (Tuxhorn et al., 2001). A matriz extracelular é composta basicamente por fibras colágenas, reticulares e elásticas, proteoglicanos e glicoproteínas estruturais (Lin & Bissel, 1993; Kreis & Vale, 1999). As fibras colágenas conferem resistência ao tecido, enquanto a elastina e os proteoglicanos são fundamentais para a elasticidade da matriz (Kreis & Vale, 1999, Tuxhorn et al., 2001). Assim, células estromais associadas a matriz extracelular criam um microambiente que regula o crescimento e diferenciação funcional das células adjacentes, desempenhando cada um desses, importante papel na manutenção da forma e função tecidual (Tuxhorn, et al., 2001; Cornell et al., 2003).

A literatura mostra que a interação epitélio-estromal tem importante papel na manutenção da estrutura e funcionamento da glândula prostática (Ekman, 2000). Baseando-se em aspectos morfológicos, funcionais e embriológicos, esta interação pode

ser considerada como uma única unidade funcional (Aumüller & Seitz, 1990; Hayward & Cunha, 2000). Os elementos estromais e epiteliais estabelecem uma rede de sistemas de sinalização intracelular, incluindo ampla variedade de fatores solúveis e insolúveis, e seus receptores que modulam a proliferação e a diferenciação das células da glândula prostática (Cunha et al., 2002).

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e a morfologia, proliferação e diferenciação (Davis & Eaton, 1991; Cunha et al, 2002) das células da glândula prostática são reguladas por andrógenos testiculares. Os andrógenos expressam seus efeitos biológicos através da interação com receptores intracelulares específicos sendo que, o complexo receptor-hormônio, associado à cromatina nuclear, regula a expressão do gene específico (Prins et al., 1991). A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos circulantes. A testosterona circulante entra nas células prostáticas, onde é convertida em um andrógeno intracelular ainda mais potente, a DHT, pela ação da enzima 5- α redutase (Toorians et al., 2003).

Apesar da próstata ser, primariamente, regulada por andrógenos, o seu desenvolvimento, tanto em humanos como em roedores, é sensível a outros hormônios, destacando-se os estrógenos que atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais do órgão quanto às alterações patológicas (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, com conseqüente redução na produção de andrógenos pelas células de Leydig e, decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002).

A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse pela enzima aromatase (citocromo P450 aromatase), expressada pelo gene Cyp19 (Fishman & Goto, 1981). Esta enzima é um regulador crítico entre o balanço de andrógeno e estrógeno, a qual contribui para o nível circulante e no tecido desses hormônios (Risbridger et al., 2003). Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desse hormônio em receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Risbridger et

al., 2001; Cunha et al., 2002). Prins et al. (2001) verificaram que as respostas crônicas ou agudas dos hormônios estrogênicos são mediadas principalmente por receptores α .

PATOLOGIAS PROSTÁTICAS

A morfologia e a fisiologia da próstata têm sido examinadas com particular atenção devido às condições patológicas que atingem esse órgão. Dentre essas, pode-se destacar a Hiperplasia Benigna (HBP) e o Câncer Prostático (Marcelli & Cunningham, 1999; Leav et al., 2001). A HBP caracteriza-se por uma predominante proliferação estromal e, embora um aumento substancial do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997). O Câncer de Próstata, em contraste, é considerado uma doença do epitélio e, freqüentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). Sabe-se que, o desenvolvimento do carcinoma prostático é de natureza endócrina e que a possibilidade de ocorrer aumenta com a idade (Davies & Eaton, 1991). Entretanto, fatores extrínsecos como o hábito alimentar e o consumo de cigarros de tabaco e bebidas alcoólicas estão sendo associados ao desencadeamento do carcinoma prostático. Segundo Guess (2001), constituem fatores de risco uma dieta altamente calórica, incluindo o consumo excessivo de gordura, e/ou carboidratos refinados, e/ou carne vermelha, e/ou bebidas alcoólicas, e/ou uma dieta pobre em cereais, frutas e vegetais, principalmente, amarelos e verdes.

Atualmente, a importância dos hormônios androgênicos e estrogênicos tem sido demonstrada no desenvolvimento de patologias prostáticas a partir de estudos clínicos e experimentais (Marcelli & Cunningham, 1999; Cunha et al., 2002; Tuxhorn et al., 2001; Risbridger et al., 2003).

A regulação da proliferação celular no carcinoma prostático é um fenômeno complexo que envolve muitos componentes, incluindo elementos da matriz extracelular e mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos, onde o estroma tem papel fundamental (Cornell et al, 2003).

O desequilíbrio da interação epitélio-estromal na glândula prostática favorece a formação do carcinoma prostático (Cunha et al., 2002). As células estromais associadas às células tumorais respondem aos andrógenos, estrógenos e fatores de crescimento

influenciando na interação epitélio-estromal, iniciando o processo de crescimento, migração, angiogênese, apoptose e metástases tumorais (Wong et al., 2000; Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2002; Cornell et al, 2003).

À partir da literatura, pode-se observar que tanto no alcoolismo crônico como no tabagismo, importantes alterações ocorrem na glândula prostática. As alterações provenientes do uso crônico dessas drogas certamente comprometem o processo reprodutivo. Contudo, os mecanismos envolvidos na patogênese glandular a partir dessas alterações precisam ser estabelecidos.

Especula-se que fatores envolvidos na regulação do microambiente estromal e na interação epitélio-estromal sejam elementos primários na patogênese prostática. Assim, a evidenciação de elementos que estejam alterados e afetem a interação epitélio-estromal fornecerão sinais decisivos na prevenção da progressão e tratamento da malignescência prostática.

II-OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram caracterizar as alterações estruturais das células epiteliais e do estroma e, a expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos α na próstata ventral de ratos sob o efeito da ação concomitante de nicotina e etanol, bem como cada uma dessas drogas isoladamente, além dos níveis plasmáticos dos hormônios testosterona e estrógenos. Também, foi objetivo estabelecer associações das interações epitélio-estromal frente a possível patogênese glandular.

III-MATERIAIS E MÉTODOS

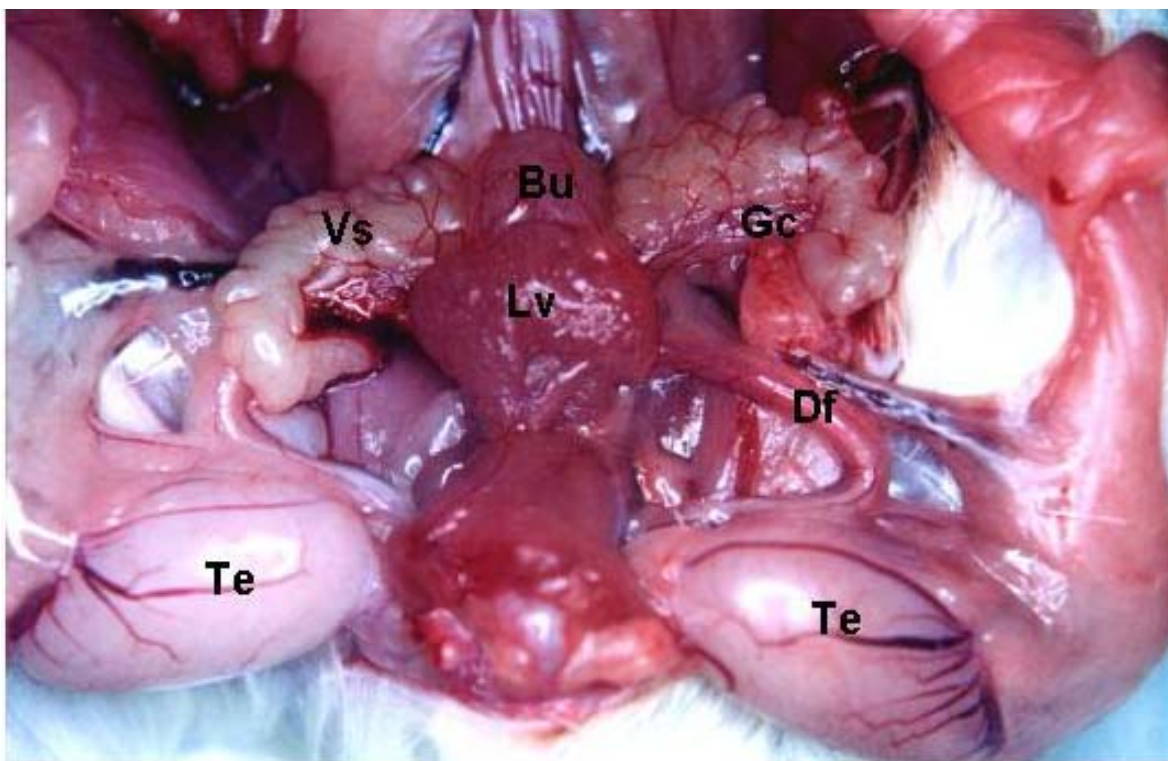
No presente trabalho foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*) com 75 dias de idade, correspondente ao período reprodutivo do animal, obtidos no Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo controle (10 animais) recebeu água *ad libitum*; Grupo alcoolista (10 animais) recebeu etanol diluído a 10% *Gay Lussac* (10% v/v) *ad libitum* (Martinez et al., 1997; Gomes et al., 2002); Grupo nicotina (10 animais) recebeu um total de 0,125mg/100g de peso corpóreo diariamente de nicotina (Sigma, St. Louis, USA) por via subcutânea (Riesenfeld & Oliva, 1988); Grupo nicotina-álcool (10 animais) recebeu tratamento simultâneo com etanol e nicotina, em condições similares aos grupos alcoolista e nicotina. Antecedendo o início do experimento, nos grupos nicotina e nicotina-álcool foram administradas doses gradativas de nicotina. Injeções de 0,0625mg/ 100g da droga foram realizadas durante duas semanas, seguindo-se injeções de 0,125mg/ 100g por 90 dias de experimento (Riesenfeld & Oliva, 1988). Os animais dos quatro grupos experimentais foram mantidos na condição de tratamento durante 90 dias. Os animais dos quatro grupos experimentais receberam a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Semanalmente, foram realizadas mensurações dos consumos líquido e sólido.

Após os 90 dias de tratamento, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500 e sacrificados. Amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas para análises macroscópicas, histoquímica e microscopias de luz, eletrônica de

transmissão e confocal. Também, os testículos, vesículas seminais e glândulas de coagulação foram retirados e pesados.

III.1- Macroscopia

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com Francotar/Virbaxyl (1:1) na dosagem de 0,25 ml para cada 100 gramas de peso corpóreo. A seguir, esses foram colocados em decúbito dorsal com posterior incisão da parede abdomino-pélvica expondo-se o complexo urogenital. Parte desse complexo que incluiu próstata, glândula de coagulação, vesícula seminal, uretra, bexiga urinária, testículos, ureteres e ductos deferentes foi dissecado com auxílio do microscópio cirúrgico DF Vasconcelos. Posteriormente, o complexo foi fotografado, no interior da cavidade abdomino-pélvica com máquina modelo Stotimatic-F, com objetiva macro 50 mm e filme Kodacolor Gold asa 100.



Exposição da região abdômino-pélvica do rato controle. Lobo ventral da próstata (**LV**), bexiga urinária (**Bu**), glândula de coagulação (**Gc**), vesícula seminal (**Vs**), ducto deferente (**Df**) e testículos (**TE**). Aumento: X5,5.

III.2- Microscopia de Luz

Amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas de 5 animais, de cada grupo experimental, e fixadas em solução de Bouin por doze horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico à 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e incluídos em parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA*). Em seguida, o material foi seccionado em micrótomo (Biocut – Modelo 1130) com espessura de 5 micrômetros, corados com Hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson (Junqueira *et al.*, 1979), Reticulina de Gömori (Vilamaior *et al.*, 2000), fotografado no fotomicroscópio (*Nikon Eclipse E-400*) e, submetidos à análises morfométricas.

III.3- Microscopia Eletrônica

Um total de 5 animais de cada grupo experimental foi perfundido com solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), através do ventrículo esquerdo do coração. Antecedendo-se a perfusão, foi realizada lavagem do sistema circulatório com solução fisiológica heparinizada (Sprando, 1990).

A próstata ventral foi coletada e fragmentada com 0,5 mm de espessura. Em seguida, os fragmentos foram submetidos ao complemento de fixação, por imersão no mesmo fixador e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Os fragmentos foram incluídos em resina plástica (*Araldite, Polyscience, Niles, IL, USA*), seccionados com 0,5 micrômetro de espessura no ultramicrotomo LKB 8800 ultratome III com navalha de vidro e corados com azul de metileno e azul II. Os cortes corados foram utilizados para definir áreas específicas para o estudo em MET. Após a análise, os blocos foram trimados e submetidos a ultramicrotomia com navalha de diamante no ultramicrotomo *Ultracult UCT 020 Leica*. Os cortes obtidos foram montados em telas de cobre de 200 Mesh e contrastados pelo acetato de uranila (Watson, 1958) e pelo citrato de chumbo (Reynolds, 1963), examinados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp.

III.4- Morfometria em Microscopia de Luz

Para o estudo morfométrico foram utilizadas amostras da próstata ventral, coradas com hematoxilina e eosina, de cinco animais de cada grupo, os mesmos utilizados para a microscopia de luz.

Para quantificação do volume nuclear foram medidos os diâmetros de 20 núcleos de células epiteliais do lobo ventral da próstata de cada animal. A escolha dos núcleos foi casual, priorizando os com limites celulares definidos. As medidas foram realizadas com auxílio da ocular graduada (10X) acoplada ao microscópio de luz *Olympus CBB*, fixando-se as observações com a objetiva de 100X. A calibragem da ocular foi realizada através de lâmina especial (0,01mm, 10 μ m) (*Carl Zeiss*). A partir desses valores foram calculadas as médias dos volumes dos núcleos através da seguinte fórmula: $V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 \frac{D}{2}$, sendo “d” diâmetro menor, “D” diâmetro maior. Além disso, foram realizadas medidas para determinação quantitativa das frações de volume (V_v) ocupadas pelo núcleo e pelo citoplasma das células epiteliais da próstata ventral. Essas mensurações foram feitas através de uma ocular 10X contendo um retículo de integração quadrilátero com 100 pontos acopladas ao microscópio de luz *Olympus CBB* e objetiva de 100X. Através desse retículo foram observados e contados os pontos localizados sobre os núcleos e sobre o citoplasma das células de dez campos previamente definidos. A fração de volume ocupada pelo núcleo em relação ao citoplasma foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$V_v = p/P$$

V_v = densidade de volume ou fração de volume (%)

p = número de pontos sobre o núcleo

P = número total de pontos ou soma dos pontos sobre os núcleos e citoplasmas nos diferentes campos.

Para a determinação, em porcentagem, da área relativa (estroma X mucosa glandular) foi utilizado o programa *Image-pro® Express Version 4 software* com a objetiva 10X.

III.5- Dosagens dos Níveis de Testosterona e Estrógenos Totais no Plasma Sanguíneo

Amostras de sangue foram obtidas de 5 animais de cada grupo experimental, os mesmos destinados à microscopia de luz, através de punção cardíaca no ventrículo esquerdo. O plasma foi separado por centrifugação e, armazenado a -20°C para subseqüentes análises hormonais. As concentrações de Testosterona e Estrógenos foram mensuradas por técnica de radioimunoensaio (*Total/ Kit COAT-A-COUNT, Diagnostic Procts Corporation Los Angeles, CA, USA*).

III.6- Imunolocalização dos Receptores Androgênicos e Estrogênicos α

As amostras do lobo ventral foram coletadas de 5 animais de cada grupo experimental, destinados à microscopia de luz. Às amostras foram embebidas em meio de inclusão para baixas e médias temperaturas e, congeladas em nitrogênio líquido. A seguir foram obtidos cortes com dez micrômetros de espessura no criostato HM 505 E Microm à -24°C , coletados em lâminas silanizadas e incubados, primeiramente, em solução bloqueadora para os sítios de ligação inespecíficas proteína-proteína com albumina soro bovino (3%), em tampão PBS por 1,5 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi incubado com os anticorpos primários policlonais *anti-rabbit* AR-119 (sc-815) conjugado com fluoresceína (FITC) (*Santa Cruz Biotchenollogy*) para receptores androgênicos (AR) e *anti-rabbit* MC-20 (sc-542) conjugado com fluoresceína (FITC) (*Santa Cruz Biotchenollogy*) para receptores estrogênicos alfa ($\text{ER}\alpha$), diluídos em solução de albumina soro bovino (3%) em tampão PBS (1 : 50) por 1,5 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram montadas em DABCO (*Sigma Chemical CO*) e analisadas ao microscópio Confocal (*MRC 1024 UV, Bio-Rad, CA, USA*), utilizando-se objetiva de 40X (1.2 NA, imersão em água). Um comprimento de onda de 488 nm foi usado para excitar a fluoresceína. Os parâmetros como contraste, brilho e diâmetro da íris foram ajustados e se mantiveram constantes durante todas as análises tanto do grupo controle quanto dos demais grupos experimentais. A intensidade da marcação foi graduada como intensa (+++), moderada (++) e fraca (+), de acordo com a concentração e distribuição dos receptores nos tecidos glandulares (Markopoulos et al., 2000).

III.7- Análises Estatísticas

O estudo da comparação entre grupos foi realizado através das variáveis: variação de peso (ΔP) = peso final – peso inicial (g); consumo líquido diário (mL); consumo sólido diário (g); peso dos testículos (g); pesos das vesículas seminais e, glândulas de coagulação (g), volumes do núcleo (μm^3), do citoplasma (μm^3) e celular (μm^3) e níveis de testosterona e estrógenos totais no plasma sanguíneo. A análise estatística foi realizada através da técnica de análise de variância e complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey para comparação entre as médias (Montgomery, 1991). Todas as conclusões no presente estudo foram realizadas em nível de 5% de significância.

IV- ARTIGOS CIENTÍFICOS

IV.1- **“Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment”**. Submetido: *Tissue & Cell*; abril 2006.

IV.2- **“Expressão dos Receptores Androgênicos e Estrogênicos α na Próstata Ventral de Ratos Submetidos ao Tratamento Crônico Simultâneo de Etanol e Nicotina”**. Segundo as normas: *Andrologia*.

“Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment”.

W.J., Fávaro¹; V.H.A., Cagnon¹.

1 - Department of Anatomy, Institute of Biology, The State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil.

Key words: Ventral Prostate; Nicotine; Alcohol; Ultrastructure; Stereology;

Supported by CAPES.

*Correspondence to: Dr. Valéria H. A. Cagnon, Department of Anatomy, Institute of Biology, The State University of Campinas, Campinas, Box 6109, São Paulo, Brazil.
Telephone: (55) 19-3788- 6102. Fax: (55) 19-3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br

ABSTRACT

Clinical and experimental studies have shown that chronic alcohol and nicotine use lead to harmful effects in the male reproductive process. Then, this work aimed at determining the structure and ultrastructure of the prostatic stroma and epithelium, as well as, the stroma epithelium interactions from rats submitted to simultaneous long-term alcohol-nicotine treatment. A total of 40 male rats were divided into 4 groups: Control group (10 animals) received tap water *ad libitum*; Alcoholic group (10 animals) received diluted 10% *Gay Lussac* ethanol *ad libitum*; Nicotine group (10 animals) received a 0.125 mg/100 g of body weight dose of nicotine daily; Nicotine-Alcohol group (10 animals) received simultaneous alcohol and nicotine treatment. After 90 days of treatment, the animals were sacrificed and samples from the ventral lobe of the prostate were collected and processed for transmission electron and light microscopies. The results showed atrophied epithelium; prostatic intra-epithelial neoplasia; dilated cisterns of the granular endoplasmic reticulum, large amounts of collagen fibers besides and inflammatory cells, specially in the alcoholic and nicotine-alcohol groups. Therefore, it could be concluded that the association between alcohol and nicotine caused the impairment of the prostatic secretory process. Moreover, this association is related to prostatic pathogenesis, which could lead to late glandular malignancy.

INTRODUCTION

The prostate is a hormone-dependent male accessory sex gland, found in different mammals (Setchell and Brooks, 1988; Cunha et al., 2002). In the human species, it is placed around the urethra, under the urinary bladder. Three glandular portions are described: the peripheral region, the central zone and the pre-prostatic region, all covered by a fibromuscular layer (Setchell and Brooks, 1988). In rodents, the prostate is made up of three lobes, named ventral lobe, lateral lobe and dorsal lobe, according to their relation to the urethra. The prostate lobes show not only morphological aspects but also distinct hormonal responses (Jesik et al., 1982; Setchell and Brooks, 1988).

The prostate ventral lobe has a simple epithelium with high columnar cells and stroma characterized by stromal cells and extracellular matrix, which is associated to growth factors, regulatory molecules and remodeling enzyme (Tuxhorn et al., 2001). Both stromal cells and extracellular matrix make up the microenvironment that regulates the growth and development of the glandular cells, each one of them carrying out crucial morphological and functional roles (Kreis and Vale, 1999; Tuxhorn et al., 2001).

Prostatic morphology and physiology have been examined due to different pathological aspects, which affect this organ such as benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer (Marcelli and Cunningham, 1999). The regulation of cellular proliferation in prostatic cancer is a complex process which involves various elements, including that from the extracellular matrix, besides endocrine, paracrine and autocrine mechanisms, in which not only the stroma but also the stroma-epithelium interaction have a fundamental role (Cunha et al., 2002; Cornell et al., 2003).

Different studies have shown that intrinsic factors such as epithelial cells, smooth muscle, and the extracellular matrix are known to influence the morphogenesis and prostatic gland differentiation. Still, extrinsic factors such as the environment are being included in the occurrence of prostatic pathogenesis (Chung et al., 1997).

Alcohol and its metabolites, especially acetaldehyde, lead to general disturbance in various organic systems such as hypogonadism in the male reproductive system among others (Marks and Wright, 1978; Bannister and Lowosky, 1987; Lieber, 1988; Martinez et al., 2001; Gomes et al., 2002). Ethanol is both a direct toxin, changing testosterone

production in the gonads and an indirect one altering the gonadal-hypophysis-hypothalamus axis (Van Thiel, 1983; Anderson et al., 1989; Saxena et al., 1990; Tadic, et al., 2000). Moreover, not only are the direct effects responsible for changes in the secretory epithelium of the ventral lobe of the prostate but also the indirect effects (Martinez et al., 1993).

Several experiments have verified that the main disturbances from chronic alcoholism are testicular lesions, diminished seminiferous tubules diameter, depressed testosterone level, reduced weight from accessory sex gland, atrophied cells from prostate lobes and seminal vesicle, dilatated granular endoplasmic reticulum and Golgi complex and accumulated lipidic droplets (Martinez et al., 1993; Cagnon et al., 1996; Martinez et al., 1997; Cagnon et al., 1998; Garcia et al. 1999; Cagnon et al., 2001; Sattolo et al., 2004).

Nicotine is the greatest alkaloid of tobacco, considered its main compound and responsible for harmful effects in smokers (Chinoy and Seethakshmi, 1978; Rosemberg, 1981; Chowdhury and Bromage, 2000). Besides tobacco dependence, nicotine alters the equilibrium in the various organ systems such as: cardiovascular, endocrine and the male reproductive system (Meade et al., 1987; Mjos, 1988; Zhu and Parmley, 1997; Marano, et al., 1999; Florek and Marszalek, 1999).

In the male reproductive system, decreased fertility is pointed out as being a consequence of the action of nicotine on the gonads in both clinical and experimental trials (Weisberg, 1985; Florek and Marzalek, 1999). According to Meikle, et al., (1988) nicotine and its metabolite, cotinine, are inhibitors of the 3α -hydroxysteroid dehydrogenase, an important enzyme in the testosterone and dihydrotestosterone metabolisms, which can alter the androgenic action on the prostate. Also, Reddy et al., (1998) verified that the chronic nicotine use on mice, provoked reduced testicular weight and atrophied male accessory sex glands, as a consequence of the androgenic depletion.

The changes due to chronic alcohol and nicotine use certainly compromise the reproductive process. Factors involved in the stromal environment regulation, and in the stromal epithelium interaction are indicated as important elements in the identification of prostatic pathologies. Therefore, the identification of the compounds which are altered and involved in the stroma-epithelial interaction provide important ways towards the

prevention, development and treatment of prostatic diseases. Based on this fact, the present study aimed at characterizing the structural features of the epithelial and stromal portions of the ventral lobe of the prostate in rats submitted to simultaneous chronic alcohol and nicotine treatment, as well as to each one of these drugs alone. Moreover, this work intends to establish common morphological and hormonal characteristics of the effects of these drugs in glandular pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue preparation

A total of 40 male rats, aged 75 days, were divided into 4 groups: Control group (10 animals) received tap water *ad libitum*; Alcoholic group (10 animals) received diluted 10% *Gay Lussac* ethanol *ad libitum* (Martinez et al., 1997; Gomes et al., 2002); Nicotine group (10 animals) received 0.125 mg/100 g of body weight dose of nicotine daily (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) (Riesenfeld and Oliva, 1988); Nicotine-Alcohol group (10 animals) received simultaneous alcohol and nicotine treatment, in the same concentration as the alcoholic and nicotine groups. Body weight and solid and fluid intake were measured every week for all experiment. All groups received solid Nuvilab CR1 ration (Nuvital®, Colombo, PR, Brazil) and water. After 90 days of experimental treatment, the animals were weighed on a semi-analytical scale (Marte AS 2000 C) and anesthetized with a 0.25 ml/100 g of body weight dose of Francotar/Virbaxyl (1:1, Vibra® Roseira, SP, Brazil) and samples from the ventral lobe of the prostate were collected and processed for transmission electron and light microscopies. Also, the testes, seminal vesicle and coagulating gland were withdrawn and weighed.

For histological analysis, samples of the ventral prostate were collected from five animals in each group fixed by immersion in Bouin's solution, embedded in paraplast (Paraplast Plus, Brazil), cut into 5- μ m thick sections and submitted to the following staining procedures: hematoxylin-eosin (Behmer et al., 1976), Gomori's silver impregnation for reticulin (Vilamaior et al., 2000) and Masson's trichrome (Junqueira *et al.*, 1979). The sections were photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope.

For ultrastructural analysis, 5 animals from each experimental group were anesthetized and perfused with Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965; Sprando, 1990). Samples of the ventral prostate were immersion fixed for additional 2h, followed by washing in cacodylate buffer and post fixation with 1% osmium tetroxide. Then, all the material was embedded in resin (Araldite, Polysciences, Niles, IL), cut with an ultramicrotome (Ultracult UCT 020 Leica), mounted on copper grids (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), and counterstained with uranyl acetate (Watson, 1958) and lead citrate (Reynolds, 1963). The specimens were examined and photographed under a LEO 906 transmission electron microscope.

Morphometric and stereologic procedures

Cell, cytoplasmic and nuclear epithelial volumes were measured on the paraffin sections stained for light microscopy from 5 rats per group. To determine the cytoplasmic and nuclear volumes, an ocular lens (X10) with a 100 grid coupled to an X100 objective (Carl Zeiss) was used. Points on the nucleus and on the cytoplasm were counted in 20 areas for each animal and the cytoplasmic and nuclear fractions were obtained. Long and short axes were measured and the average volume was calculated considering the nuclei as ellipsoids. These data and the nuclear volume were used to estimate the cytoplasmic volume of each animal. The cellular volume was calculated by the addition of the nuclear and cytoplasmic volumes (Weibel, 1979). Epithelial and stromal areas in the ventral lobe of the prostate were measured (25 fields per animal). The microscopic field was scanned at X200 magnification using a calibrated eyepiece (Filar Micrometer, Nikon). The areas were measured using the Image-Pro Express 4.0 computerized image analysis system.

Statistical analysis

Final weight (g), daily fluid intake (ml), daily solid intake (g), testicular weight (g), seminal vesicle weight (g), coagulation gland (anterior prostate) weight (g), cytoplasmic and nuclear volume (μm^3), and nuclear shape (μm^3) were compared between groups and treatment times by variance analysis. Statistical analysis was complemented by Tukey's

multiple range test for comparison between means (Montgomery, 1991). The level of significance was set at 5% for all analyses.

RESULTS

Body analysis

Animals from all experimental groups had body weight gain at the end of treatment period. The body weight gain was significantly higher in the control and nicotine groups than in the alcoholic and nicotine-alcohol groups (Table 1). The total number of calories obtained from ration intake was much higher in the control group (162.3 Kcal/Kg^{0.75}) than those found in the nicotine (152.5 Kcal/Kg^{0.75}), alcoholic (144.2 Kcal/Kg^{0.75}) and nicotine-alcohol groups (133 Kcal/Kg^{0.75}). The ration and liquid average intake from animals in the control and nicotine groups were significantly higher than those found in the alcoholic and nicotine-alcohol groups (Table 2).

The average weights of the seminal vesicle from animals of the control and nicotine groups were significantly higher than those from animals of the alcoholic and nicotine-alcohol groups, which are similar to each other (Table 1). The testes weights were significantly reduced in animals from alcoholic, nicotine and alcohol-nicotine groups in relation to those in the control group (Table 1). However, the coagulating gland showed no changes in their weights in all experimental groups (Table 1).

Light microscopy and stereology

Control group

The ventral lobe of the prostate showed acini of different size and infolded mucosa (Figs. 1a, 1b and 1c). The simple secretory epithelium presented tall columnar cells and basal nuclei (Figs. 1b and 1c). The epithelial cell cytoplasm showed light supranuclear regions, probably, corresponding to the Golgi complex area (Figs 1b and 1c).

The prostatic stroma showed thin collagen fibers, placed under the epithelium and intermingled with the smooth muscle cells (Figs. 1b and 1c). Reticular fibers were found around the acini, under the epithelium (Fig. 1a).

The glandular epithelial area was nearly three times greater than stromal area, 76% and 24%, respectively (Graph 1).

Alcoholic group

Decreased prostatic acini were found with less infolded mucosa than those found in the control group (Figs. 1d, 1e and 1f). The secretory epithelial cells showed drastically decreased total volume with nuclei occupying wide portion of the cytoplasm (Fig. 1f; Table 3). Epithelial evaginations were found in the secretory epithelium, demonstrating glandular projection (Fig. 1e). The average of the cellular fraction occupied by the prostatic epithelial cell nuclei in the rats from alcohol group were significantly higher than those found in the control group (Table 3).

In the prostatic stroma, increased collagen fibers were verified, characterizing stromal hypertrophy (Figs. 1e and 1f). The stromal area was larger than the epithelial area, 73% and 27%, respectively (Graph 1). The increased reticular fibers were identified distributed throughout stromal area (Fig. 1d). Also, microacini and inflammatory cells were observed in the prostatic stroma (Fig. 1d and 1f).

Nicotine group

Prostatic acini showed slightly infolded mucosa (Figs. 1g, 1h and 1i). The simple secretory epithelium presented columnar cells intermingled with basal cells (Figs. 1h and 1i). Although, the secretory epithelial cells showed no significant decrease in total volume in relation to the control group, a decrease could be observed (Table 3).

The prostatic stroma showed collagen and reticular fibers around the acini found close to the epithelium (Figs. 1g, 1h and 1i). Microacini and blood vessels were also verified in the prostatic stroma (Figs. 1h and 1i).

The glandular epithelial area was three times greater than the stroma area, 73% and 27%, respectively (Graph 1).

Nicotine-alcohol group

The identified changes are similar to those found in the alcoholic group (Figs. 1j, 1k and 1l). Significantly decreased cellular volume was observed in relation to the control and nicotine groups, although variant had been similar to alcoholic group (Table 3). Foci of epithelial stratification were found in the secretory epithelium. In these regions, the cells showed increased nuclei and abnormal nucleoli (Figs. 1m and 1n). Occurrence of epithelial evaginations was found similar to those in the alcoholic group, albeit being more frequent.

Increased collagen fibers were seen throughout the stromal area (Figs. 1k and 1l). Also, the reticular fibers were more frequent in this group than in the others (Fig. 1j). Inflammatory cells and microacini were observed in the prostatic stroma (Figs. 1j, 1k and 1l). The glandular area was around three times smaller than the stromal area (Graph 1).

Transmission electron microscopy

Control group

The high columnar cells rested on clear basal lamina, presenting basal nuclei with clear nucleoli (Figs. 2a, 2d and 2e). The cellular cytoplasm showed parallel and flattened cisternae of the rough endoplasmic reticulum and developed Golgi complex in both perinuclear and supranuclear regions (Figs. 2a and 2c). Secretory vesicles with contents of various electron densities were found in the cytoplasm (Figs. 2b and 2c). Short and fortuitous microvilli were observed in the luminal surface (Figs. 2a and 2b).

In the prostatic stroma, thin and short collagen fibers were seen (Figs. 2d and 2e). The smooth muscle cells were found underlying the epithelium (Figs. 2d and 2e).

Alcoholic group

The significantly atrophied epithelium with cuboidal cells showing irregular basal nuclei were identified (Fig. 3a, Table 3 and Graph 1). Dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex were verified in the cellular cytoplasm (Figs. 3a and 3c). Occasional vesicles containing flocculent contents were observed at the apical portion of the cell (Figs. 3a, 3b and 3c). Discontinuity of microvilli was found on the cellular apical surface (Figs. 3a and 3b).

Hypertrophied stroma with large amount of the collagen fibers was found not only underlying the epithelium but also intermingled with smooth muscle (Figs. 3d and 3e, Graph 1). The muscle cells showed infolded nuclear membrane and occasional secretory vesicles (Figs. 3a, 3d and 3e). In addition, inflammatory cells were identified in the stroma (Figs. 3d and 3e).

Nicotine group

The secretory epithelium showed numerically diminished cuboidal cells intermingled with basal cells (Fig. 4a, Table 3 and Graph 1). Dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum were found in the supranuclear cytoplasm, although some of them showed flat form (Fig. 4c). Dilated cisternae of the Golgi complex were found (Fig. 4c). Occasional vesicles, demonstrating different electron density, were found in the apical cytoplasm (Figs. 4b and 4c). Also, lipid droplets were distributed throughout the cytoplasm (Fig. 4e). Discontinuity of microvilli was found in the cellular apical surface (Figs. 4a and 4b). Continuous basal lamina was observed (Figs. 4d and 4e). Hypertrophied prostatic stroma was verified showing large amount of cells and fibrillar elements (Figs. 4d and 4e, Graph 1). The smooth muscle showed elongated cells with secretory vesicles (Figs. 4a and 4e).

Nicotine-alcohol group

Marked atrophy of epithelial cells was verified with reduced cytoplasmic cellular volume (Fig. 5a, Table 3 and Graph 1). Dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum and Golgi complex were found (Figs. 5b and 5c). Occasional stratification of the epithelial cells was observed characterizing prostatic intraprostatic neoplasia (PIN) (Fig. 5g). Mitochondria presented rupture of their cristae and occasional secretory vacuoles were verified in the cellular cytoplasm (Fig. 5b). Furthermore, there was the occurrence of lipidic droplets and occasional digestory vacuoles (Figs. 5a and 5f).

Increased collagen fibers could be seen in the prostatic stroma, not only underlying the epithelium but also throughout the stromal area (Figs. 5d, 5e and 5f, Graph 1). The smooth muscle cells showed infolded sarcolemma, characterizing spinous aspect as well as

secretory vesicles (Fig. 5d). Also, inflammatory cells and blood vessels were characterized in the stroma (Figs. 5e and 5f).

DISCUSSION

Long-term alcohol and nicotine-alcohol treatment led to atrophied male sexual organs such as the testes and prostate, whereas the changes characterized in the nicotine group were less drastic than those verified in the others. However, the weights of the coagulating glands did not suffer alterations in the different experimental groups. The ration and liquid intake and the body weight were significantly reduced in both the alcohol and nicotine-alcohol groups, at the end of experiment, representing an average intake of 144.2 Kcal/Kg^{0.75} to 133.0 Kcal/Kg^{0.75}, respectively. In contrast, daily averages of these calories in the animals from nicotine groups were 195.6 Kcal/Kg^{0.75}, similar to those observed in the control group. Tadic et al. (2000) verified that rats ingesting ethanol for three months showed atrophied testes. However, Cagnon et al. (2001) demonstrated that there were no significant changes in both the coagulating gland and seminal vesicle in mice (C57BL/6j) submitted to ethanol treatment for 120 days. Moreover, a nicotine experimental study, using various doses and periods of administration of this drug, led to atrophied testes and accessory sex glands (Meikle et al., 1988; Riesenfeld and Oliva, 1988; Londonkar et al., 1998; Reddy et al., 1998; Kavitharaj and Vijayammal, 1999; Aydos et al., 2001). Also, Londonkar et al. (1998) verified diminished epididymis and deferent duct weights in rats submitted to nicotine treatment. Experimental morphological studies in animals submitted to chronic simultaneous treatment of alcohol and nicotine have been concerned about the nutritional state of these animals. These studies characterized lower weight gain in these animals than in those of the control group (Klassen and Persaud, 1978; Meikle, et al., 1988; Riesenfeld and Oliva, 1988; Reddy, et al., 1998). According to National Research Council (1995), the daily needs of energy, as to keep basic corporal activities are close to 110 Kcal/Kg^{0.75} of body weight. Thus, it can be concluded that ethanol alone or in association with nicotine caused harmful damages to the gonads, accessory sex glands and body weights. The single effects of the nicotine treatment, albeit negatively influencing the

macroscopical features of these organs, were less aggressive than the alcohol treatment *per se*. Furthermore, it can be concluded that every rat ingested a sufficient amounts of calories to maintain their basic corporal needs.

In the present study, deep structural changes were observed especially in both the alcoholic and nicotine-alcohol groups, being less intense in the nicotine group. These alterations are represented by epithelial atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, disorganization of the secretory organelles, stromal hypertrophy, occurrence of microacini and inflammatory cells, besides smooth muscular cells showing phenotypic features. Different experiments, which submitted rats to chronic alcohol treatment with various alcohol doses, demonstrated harmful effects from alcohol in the epithelial cells of the ventral lobe of the prostate. Martinez et al. (1993) showed dilated cisternae of the granular endoplasmic reticulum, occasional microvilli and irregular nuclei in the epithelial cells from the ventral lobe of the prostate in rats submitted to 35% chronic ethanol treatment. In the same way, Sáttolo et al. (2004) verified characteristic morphological changes from cellular degeneration, such as: epithelial atrophy, rupture of the mitochondrial cristae and increased secretory vacuoles and accumulation of the lipidic droplets in the secretory cell cytoplasm of the ventral prostate of the prostate in rats from the alcohol group. Also, Gomes et al. (2002) observed diminished cellular volume and important changes in the secretory organelles involved in the secretory process of the epithelial cells of the seminal vesicle of mice in the alcohol group. The authors believe that the harmful changes in the epithelial cells are caused by the harmful action of alcohol on the hypothalamus-hypophysis-gonad axis.

Literature has not shown morphological and functional aspects of the ventral lobe of the prostate related to chronic nicotine treatment. However studies submitting rats to chronic nicotine treatment verified testicular changes characterized by the degeneration of the germinative cells and also the accumulation of lipidic droplets on this organ,(Reddy et al., 1998; Aydos et al., 2001).

On the other hand, studies related to mechanical and chemical castration showed morphological and functional changes in the male accessory sex glands, resembling those observed in the animals submitted to nicotine as well as to alcohol treatments (Horsfall et

al., 1994). Experiments using both mechanical and chemical castration demonstrated structural alterations in the different prostatic lobes such as decreased epithelial cells, reduced seminiferous duct length and diameter (Yamashita et al., 1996; Vilamaior et al., 2000). Also, Bostwick et al. (1996) verified atrophied prostatic acini in rats submitted to castration after 21 days. Aumüller and Seitz (1990) stated that the androgenic impairment led to the degradation of the biological membrane of the male sexual sex glands, such as dilated granular endoplasmic reticulum and Golgi complex. Furthermore, Vilamaior et al. (2000) verified a steady rise of the number of collagen fibers in the extracellular matrix in rats which were submitted to orchidectomy. In addition to chemical castration which was carried out by finasteride, there was an increase in the collagen fibers under the basal membrane, besides being intermingled with smooth muscle cells of the prostate of the gerbil (Corradi et al., 2004). Also, other castrated animals demonstrated smooth muscle cells with altered phenotypic features as a consequence of the decreased testosterone levels. These alterations are related not only to the synthesis of elements from extra cellular matrix but also to the demodulation of the fibrillar elements in the stroma (Vilamaior et al., 2000). Moreover, authors identified altered phenotype of muscle cells as a consequence of different lesions, including prostatic cancer. The authors characterized these cells as miofibroblast, being secretory cells with intermediate features between fibroblast and smooth muscle cells (Wong et al., 2000; Tuxhorn et al., 2001).

Furthermore, literature showed that stroma-epithelium interactions have a fundamental role in both the structural and functional development of the prostatic gland (Ekman, 2000). However, based on morphological, functional and embryological aspects, this interaction could be considered a single functional unit (Aumüller and Seitz, 1990). The stromal and epithelial elements in the prostatic gland established a net of systems of intracellular signals, including soluble and insoluble factors and their receptors, which modulate cellular proliferation and differentiation of the prostatic cells (Davies and Eaton, 1991; Cunha et al., 2002).

Then, it was concluded that the chronic ingestion of nicotine and ethanol, as well as the association of these drugs provoked harmful damages to the prostatic gland in both epithelial and stromal compartments. The harmful alterations and disorganization of the

secretory organelles involved in the secretory process, apart from stromal hypertrophy led to glandular imbalance that certainly compromised the secretory process. Moreover, it was concluded that nicotine *per se* had prejudicial effects of less intensity than just alcohol or both alcohol and nicotine, simultaneously.

Prostatic intraepithelial neoplasia is classified as a precursory lesion of invasive adenocarcinoma, which could cause malignancy by the occurrence of focal epithelial stratification, diminished secretory capacity or nuclear deformity (Davidson et al., 1995; Häggman et al., 1997; Xie et al., 2000; Alberts and Blute, 2001). Prostatic stroma elements have been marked as being crucially important in both the onset and development of glandular carcinogenesis (Cunha et al., 2002). According to Cornel et al. (2003) the regulation of prostatic carcinoma is a complex process, involving extracellular matrix compounds, besides paracrine, endocrine and autocrine mechanisms. Stromal cells related to tumoral cells are influenced by androgens and growth factors, influencing the stromal-epithelial interactions, which lead to the growth, migration, angiogenesis, apoptosis and metastatic processes (Wong et al., 2000; Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2002; Cornell et al., 2003). These authors believe that the stromal environment changes, involving cells and extracellular matrix, are the main steps to the development of prostatic carcinoma. Billis and Magna (2003) stated that both pos-atrophic hyperplasia and simple focal atrophy are related to inflammatory process. The process of inflammation is a result of the overflowing of the prostatic secretion from the stroma, after interrupting the prostatic ducts (Billis, 2000). Nowadays, studies have shown the influence of inflammation infiltrated in the maintenance and progression of the tumors (Wilson and Balkwill, 2002; Lin and Pollard, 2004). To conclude, the occurrence of the inflammatory cells, simultaneous with the appearance of the prostatic intraepithelial neoplasia and stromal hypertrophy, indicates the effective influence of these cells under the disorganization of the stromal-epithelial interaction. On the other hand, the occurrence of the inflammatory cells could have occurred after chronic alcohol use, being intensified by harmful effects of this drug associated to nicotine use, which produce the overflow of prostatic secretion into the stroma. These aspects justified the occurrence of an inflammatory process. Lastly, it could be concluded that extrinsic factors such as ethanol and nicotine are risk compounds for

glandular homeostasis, leading to organ pathogeneses. These pathogeneses could be related to a late malignancy process. Moreover, the association of ethanol and nicotine certainly increases the chance of the structural disturbance during the reproductive period of rats, causing decreased male fertility.

REFERENCES

- Alberts, S.R., Blute, M.L., 2001. Chemoprevention for prostatic carcinoma: The role of flutamide in patients with Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Urology* 57, 188-190.
- Anderson, Jr. R.A., Philips, J.F, Zaneveld, L.J.D., 1989. Chronic ethanol ingestion during puberty alters the transient increase in testicular 5 α -reductase in the Swiss-Webster mouse. *J. Androl.* 10, 28-36.
- Aumuller, G., Seitz, J., 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int. Rev. Cytol.* 121, 127-231.
- Aydos, K., Guven, M.C., Can, B., Ergun, A., 2001. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. *BJU Int.* 88, 622-626.
- Bannister, P., Lowosky, M.S., 1987. Ethanol and hypogonadism. *Alcohol* 22, 213-217.
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas-Neto, A.G., 1976. Manual para histologia normal e patológica. Edart-Edusp, São Paulo, 225.
- Billis, A., 2000. Sistema Genital Masculino. In: Bogliolo, L. Ed. Patologia. 6th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 514-537.
- Billis, A., Magna, L.A., 2003. Inflammatory atrophy of the prostate. *Arch Pathol Lab Med.* 127, 840-844.
- Bostwick, D.G., Pacelli, A., Lopez-Beltran, A., 1996. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 29, 117-134.
- Cagnon, V.H.A., Garcia, P.J., Martinez, M., Padovani, C.R., 1996. Ultrastructural study of the coagulating gland of wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *Prostate* 28, 341-346.
- Cagnon, V. H. A., Garcia, P. J., Guazelli Filho, J., Martinez, F.E., Mello Jr., W., Martinez, M., 1998. Ultrastructural study of the lateral lobe of the prostate of Wistar rats

- submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30, 77-84.
- Cagnon, V.H.A., Tomazini, F.M., Garcia, P.J., Martinez, M., Padovani, C.R., Martinez, F.E., 2001. Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57Bl/6J) submitted to chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell* 33, 354-360.
- Chinoy, N.J., Seethakshmi, L., 1978. Effects of drugs on the reproductive physiology of male albino rats: Part II – Nicotine & morphine. *Indian J. Exp. Biol.* 16, 323-325.
- Chowdhury, I.G., Bromage, T.G., 2000. Effects of fetal exposure to nicotine on dental development of the laboratory rat. *Anat. Rec.* 258, 397-405.
- Chung, L., Kozlowski, J.M., Grayhack, J.T., 1997. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 31, 131-138.
- Cornell, R.J., Rowley, D., Wheller, T., Ali, N., Ayala, G., 2003. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology* 61, 870-875.
- Corradi, L.S., Goes, R.M., Carvalho, H.F., Taboga, S.R., 2004. Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72, 198-208.
- Cunha, G.R., Risbridger, G., Wang, H., Young, P., 2001. Evidence that epithelial mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev. Biol.* 229, 432-442.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70, 473-485.
- Davidson, D., Bostwick, D.G., Qian, J., Wollan, P.C., Oesterling, J.E., Rudders, R.A., Siroky, M., Stilmant, M., 1995. Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: predictive accuracy in needle biopsies. *J. Urol.* 154, 1295-1299.
- Davies, P., Eaton, L.C., 1991. Regulation of prostate growth (Review). *J. Endocrinol.* 131, 5-17.

- Ekman, P., 2000. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate* 10, 14-18.
- Florek, E., Marszalek, A., 1999. An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 272-278.
- Garcia, P.J., Cagnon, V.H.A., Mello JR., W., Martinez, M., Martinez, F.E., 1999. Ultrastructural observations of the dorsal lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *Rev. Chil. Anat.* 17, 153-159.
- Gomes, I.C., Cagnon, V.H., Carvalho, C.A., De Luca, I.M., 2002. Stereology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell* 34, 177-186.
- Häggman, M.J., Macoska, J.A., Wojno, K.J., Oesterling, J.E., 1997. The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *J. Urol.* 158, 12-22.
- Horsfall, D.J., Mayne, K., Skinner, J.M., Saccone, G.T., Marshall, V.R., Tilley, W.D., 1994. Glycosaminoglycans of guinea pig prostate fibromuscular stroma: influence of estrogen and androgen on levels and location of chondroitin sulfate. *Prostate* 25, 320-332.
- Jesik, C.J., Holland, J.M., Lee, C., 1982. Na anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3, 81-97.
- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., Brentani, R., 1979. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem.* 11, 447-455.
- Karnovsky, M.J., 1965. The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by coupled peroxidatic oxidation. *J. Histochem Cytochem.* 13, 604-605.
- Kavitharaj, N.K., Vijayammal, P.L., 1999. Nicotine administration induced changes in the gonadal functions in male rats. *Pharmacology* 58, 2-7.
- Klassen, R.W., Persaud, T.V., 1978. Influence of alcohol on the reproductive system of the male rat. *Int. J. Fertil.* 23, 176-184.
- Kreis, T., Vale, R., 1999. Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. Oxford University Press, New York.

- Lieber, C.S., 1988. Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem. Soc. Trans.* 16, 241-247.
- Lin, E.Y., Pollard, J.W., 2004. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br.J.Cancer* 90, 2053-2058.
- Londonkar, R.L., Srinivasreddy, P., Somanatheddy, P., Patil, S.B., 1998. Nicotine induced inhibition of the activities of accessory reproductive ducts in male rats. *J. Ethnopharmacol.* 60, 215-221.
- Marano, G., Ramirez, A., Mori, I., Ferrari, A.U., 1999. Sympathectomy inhibits the vasoactive effects of nicotine in conscious rats. *Cardiovasc. Res.* 42, 201-205.
- Marcelli, M., Cunningham, G., 1999. Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3463-3468.
- Marks, V., Wright J., 1978. Metabolic effects of alcohol. *Clin. Endocrinol. Metab.* 7, 245-466.
- Martinez, F.E., Garcia P.J., Padovani C.R., Cagnon, V.H.A., Martinez M., 1993. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *Prostate* 22, 1-8.
- Martinez, F.E., Garcia, P.J., Padovani, C.R., Cagnon, V.H.A., Martinez M.A., 1997. Morphometric ultrastructural study of the seminal vesicle of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 29, 537-542.
- Martinez, F.E., Laura, I.A., Padovani, C.R., Bustos-Obregon, E., 2001. Morphology of the ventral lobe of the prostate and seminal vesicles in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UchB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 33, 99-106.
- Meade, T.W., Imeson, J., Stirling, Y., 1987. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet* 31, 986-988.
- Meikle, A.W., Liu, X.H., Taylor, G.N., Stringham, J.D., 1988. Nicotine and cotinine effects on 3 alpha hydroxysteroid dehydrogenase in canine prostate. *Life Sci.* 43, 1845-1850.
- Mjos, O.D., 1988. Lipid effects of smoking. *Am. Heart J.* 115, 272-275.
- Montgomery, D.C., 1991. Design and analysis of experiments. 3th Ed. John Wiley, New York, 649.

- National Research Council., 1995. Nutrient requirements of laboratory animals. 4th ed, National Academy Press, Washington, DC 192.
- Reddy, S., Londonkar, R., Patil, S.B., 1998. Testicular changes due to graded doses of nicotine in albino mice. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 42, 276-80.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biology* 17, 208.
- Riesenfeld, A., Oliva, H., 1988. Effects of nicotine on the fertility, cytology and life span of male rats. *Acta Anat (Basel)* 131, 171-176.
- Rosemberg, J., 1981. Tabagismo, sério problema de Saúde Pública. Almed: Edusp, São Paulo, 370.
- Sattolo, S., Carvalho, C.A.F., Cagnon V.H.A., 2004. Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue Cell* 36, 417-430.
- Saxena, S., Meehan, D., Coney, P., Wimalasena, J., 1990. Ethanol has direct inhibitory effects an steroidogenesis in human granulosa cells: specife inhibition of LH action. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14, 522-527.
- Setchell, B.P., Brooks, P.E., 1988. Anatomy, vasculature. Innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J., eds. *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, 753-836.
- Sprando, R.L., 1990. Perfusion of rat testis through the heart using heparin. In: Russel, L.D., Etilin, A. P.S., Cleeg, E.D. *Histological and Histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, 277-280.
- Tadic, S.D., Elm, M.S., Subbotin, V.M., Eagon, P.K., 2000. Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. *Hepatology* 31, 1135-1140.
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Smith, M.J., Smith, V.C., Dang, T.D., Rowley, D.R., 2002. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracelular matrix remodeling. *Clin. Cancer Res.* 8, 2912-2923.
- Van Thiel, D.H., 1983. Ethanol; its adverse effects upon the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J. Lab. Clin. Med.* 101, 21.

- Vilamaior, P.S., Felisbino, S.L., Taboga, S.R., Carvalho, H.F., 2000. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* 45, 253-258.
- Xie, W., Wong, I.C., Tsao, S.W., 2000. Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *Prostate* 44, 31-39.
- Watson, M.L., 1958. Staining of tissues sections for electron-microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 475.
- Weisberg, E., 1985. Smoking and reproductive health. *Clin. Reprod. Fertil.* 3, 175-186.
- Wilson, J., Balkwill, F., 2002. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 12, 113-120.
- Wong, Y.C., Xie, W., Tsao, S.W., 2000. Structural changes and alteration in expression of TGF-beta1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. *Prostate* 45, 289-298.
- Yamashita, A., Hayashy, N., Sugimura, Y., Cunha, G.R., Kawamura, J., 1996. Influence of diethylstilbestrol, Leuprolelin (a luteinizing hormone-releasing hormone analog), Finasteride (a 5 alpha-reductase inhibitor), and castration on the lobar subdivisions of the rat prostate. *Prostate* 29, 1-14.
- Zhu, B.Q., Parmley, W.W., 1995. Hemodynamic and vascular effects of active and passive smoking. *Am. Heart J.* 130, 1270-1275.

Table 1: Average and standard deviation of the variation (g) in body weight (ΔP), seminal vesicle, coagulating gland and testis weight in the four experimental groups and results of statistical test.

Variants	Groups				CV (%)	DMS (5%)
	Control	Alcoholic	Nicotine	Nicotine-Alcohol		
ΔP	341.0 \pm 81.5 b	309.5 \pm 59.7 a	331.2 \pm 74.1 b	262.1 \pm 48.5 a	5.9	15.4
Seminal Vesicle	0.82 \pm 0.06 b	0.54 \pm 0.08 a	0.69 \pm 0.07 b	0.56 \pm 0.11 a	12.98	0.11
Coagulating Gland	0.08 \pm 0.01 a	0.07 \pm 0.01 a	0.07 \pm 0.01 a	0.07 \pm 0.01 a	16.43	0.02
Testis	2.02 \pm 0.12 b	1.75 \pm 0.10 a	1.87 \pm 0.12 a	1.73 \pm 0.12 a	6.36	0.16

^{a,b} Average comparison between experimental groups ($P > 0.05$) by Tukey's test

Table 2: Average and standard deviation of the ration (g) and liquid consumptions (ml) of the rats from four experimental groups.

Variants	Groups				CV (%)	DMS (5%)
	Control	Alcoholic	Nicotine	Nicotine-Alcohol		
Ration	421.0 \pm 61.0 b	373.7 \pm 25.8 a	395.5 \pm 26.5 b	343.5 \pm 57.1 a	11.3	35.9
Liquid	698.1 \pm 91.2 b	435.9 \pm 80.8 a	648.1 \pm 117.9 b	388.2 \pm 57.7 a	7.4	33.3

^{a,b} Average comparison between experimental groups ($P > 0.05$) by Tukey's test

Table 3: Average and standard deviation of the nuclear (NCL) and cytoplasmic (CIT) volumes (μm^3) of the epithelial cells of the ventral lobe of rats from for experimental groups and result of the statistical tests.

Variants	Groups				CV (%)	DMS (5%)
	Control	Alcoholic	Nicotine	Nicotine-Alcohol		
NCL Vol	100.3 \pm 7.9 a	92.5 \pm 7.3 a	95.2 \pm 3.3 a	90.4 \pm 7.7 a	7.21	9.1
CYT Vol	514.6 \pm 52.7 b	307.0 \pm 54.8 a	416.7 \pm 24.4 b	300.4 \pm 35.6 a	11.37	58.6
Total Vol	614.9 \pm 59.4 b	399.5 \pm 55.6 a	511.9 \pm 27.5 b	390.8 \pm 42.2 a	9.98	64.1
NCL %	16.3 \pm 0.8 a	23.4 \pm 3.3 b	18.6 \pm 0.4 a	23.2 \pm 1.2 b	8.83	2.41
CYT %	83.7 \pm 0.8 b	76.6 \pm 3.3 a	81.4 \pm 0.5 b	76.8 \pm 1.2 a	2.26	2.41

^{a,b} Average comparison between experimental groups ($P > 0.05$) by Tukey's test

Abreviattions

NCL Vol - Nuclear Volume

CYT Vol - Cytoplasmic Volume

Total Vol - Total Volume

NCL % - Nuclear Percentage

CYT % - Cytoplasmic Percentage

FIGURE LEGENDS

Figure 1 (a-c): Photomicrographs of the ventral lobe of the prostate from control group.

1a: Reticular fibers (**fr**) underlying the epithelium (**Ep**), surrounding the prostatic acini. X150. Gomöri's reticulin.

1b: Folded mucosa with tall columnar and basal cells (**B**). Lumen (**L**). Clear supranuclear region with secretory vesicles and Golgi complex area (**G**). Clear stroma (**Es**) containing thin and short collagen fibers (**fc**). X150. Masson's trichrome.

1c: Secretory cells with nitid nuclei (**Nu**) and basal cells (**B**). Clear areas, corresponding to vesicle (**G**) and Golgi complex areas are noticed in the supranuclear cytoplasm. Large amount of collagen fibers (**fc**) is observed in the prostatic stroma, adjacent to the epithelium, intermingled with smooth muscle cells (**cml**). X1000. Masson's trichrome.

Figure 1 (d-f): Photomicrographs of the ventral lobe of the prostate from alcoholic group.

1d: Increased reticular fibers (**fr**), distributed throughout stromal area. Microacini (**ma**) are verified in the stroma. X150. Gömori's reticulin.

1e: Acini showing poorly folded mucosa and intra-luminal secretion (**L**) are verified. Secretory epithelium (**Ep**) with decreased columnar cells. Epithelial evagination (**arrow**) is verified, compounded by cells, stroma protruding cells. Hypertrophied stroma with collagen fibers (**fc**). X 150. Masson's trichrome.

1f: Decreased secretory epithelial cells are observed, presenting nitid nuclei and nucleoli (**Nu**). Evident collagen fibers (**fc**), occupying all inter-epithelial areas of the stroma were verified, besides smooth muscle cells (**cml**) and other cellular forms (**dtc**). Inflammatory cells (**ci**) among other fibrillar elements are verified. X1000. Masson's trichrome.

Figure 1 (g-i): Photomicrographs of the ventral lobe of the prostate from nicotine group.

1g: Stroma (**Es**) with reticular fibers are verified (**fr**), distributed underlying the epithelium. X150. Gomöri's reticulin.

1h: Secretory epithelium (**Ep**) with tall columnar cells, lumen (**L**) and basal cells. Clear supranuclear region with secretory vesicles and Golgi complex area (**G**). Stroma with collagen fibers (**fc**) located often under epithelium, besides microacini (**ma**) and blood vessels (**vs**). X150. Masson's trichrome .

1i: Glandular epithelium with columnar cells, intermingled with basal cells (**B**) is verified. Epithelial cells with basal nuclei and nitid nucleoli (**Nu**) are seen. Clear stroma with collagen fibers (**fc**) placed around smooth muscle cells (**cml**) is evidenced. Blood vessels (**vs**) and other cellular forms (**dte**) are seen. X1000. Masson's trichrome .

Figure 1 (j-n): Photomicrographs of the ventral lobe of the prostate from nicotine-alcohol group.

1j: Increased reticular fibers (**fr**), distributed throughout stroma are seen. Microacini (**ma**) are verified. X150. Gomöri's reticulin.

1k: Blood vessels (**Vs**) and inflammatory cells (**star**) are verified in the glandular stroma (**Es**). X150. Hematoxilin-Eosin.

1l: Secretory epithelium with atrophied columnar cells. Cellular nuclei, occupying large portion of the cytoplasm with nucleoli (**Nu**) are noted. Stroma is compounded by large amount of collagen fibers (**fc**), which are regularly distributed in this portion, besides smooth muscle cells (**cml**). There is occurrence of inflammatory cells (**ci**) among other fibrilar elements and microacini (**ma**). X1000. Masson's trichrome.

1m and 1n: Prostatic acini with focus of epithelial stratification, known as prostatic intraepithelial neoplasm (**arrow**) are verified. Stroma (**Es**). Lumen (**L**). X150 and X430, respectively. Masson's trichrome.

Figure 2 (a-e): Electron micrographs of the epithelial cells of ventral lobe of the prostate from control group.

2a: Simple epithelium with tall columnar cells. Basal nuclei (**N**) with nitid nucleoli (**Nu**). Cisternae of the rough endoplasmic reticulum (**RER**) with low electron density material in the perinuclear cytoplasm. Mitochondria (**arrow**). Microvilli cover the apical cellular surface (**Mv**). Lumen (**L**). Stroma (**St**).

2b: Apical region. Short and fortuitous microvilli (**Mv**) covering cellular surface. Vesicles (**Vs**) with granulated contents of various electron densities. Junctional complex (**J**) between neighborhood cells. Lumen (**L**).

2c: Supranuclear region. Parallel and flattened cisternae of the Golgi complex (**arrows**) and secretory vesicles (**Vs**) in different maturation stages. Mitochondria (**M**). Glandular lumen (**L**).

2d: Smooth muscle cells (**SM**), distributed around of epithelium (**Ep**) containing occasional secretory vesicles (**open arrow**). Thin collagen fibers (**col**). Continuous basal lamina (**arrow**). Mitochondria (**M**).

2e: Basal region. Nucleus (**N**), Basal lamina (**arrow**). Collagen fibers (**col**) adjacent to epithelium and intermingled with smooth muscle cells (**SM**).

Figure 3 (a-e): Electron micrographs of the epithelial cells of ventral lobe of the prostate from alcoholic group.

3a: Atrophied epithelium with cuboidal cells intermingled with basal cells (**Bc**). Irregular shaped nuclei (**N**) with nitid nucleoli (**Nu**). Dilated cisternae of the Golgi complex (**arrow**). Secretory vesicles (**Vs**). Lumen (**L**). Stroma (**St**), containing smooth muscle cells (**SM**) underlying the epithelium with occasional secretory vesicles (**open arrow**).

3b: Apical region. Short and sparse microvilli (**Mv**) on the luminal surface. Occasional vesicles (**Vs**) with flocculent and low electron density contents in the supranuclear region. Mitochondria (**M**). Lumen (**L**).

3c: Supranuclear region. Dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum (**asterisc**) and Golgi complex (**arrows**). Secretory vesicles (**Vs**) and mitochondria (**M**). Lumen (**L**).

3d: Basal region. Nuclei of the epithelial cell (**N**). Basal lamina (**arrow**). Stroma with collagen fibers (**col**) intermingled with smooth muscle cells (**SM**), besides secretory vesicles (**open arrow**), and inflammatory cells (**Ci**). **Inset:** Mitochondria (**M**) with rupture of the mitochondrial cristae (X10000).

3e: Stroma with collagen fibers (**col**) distributed in both underlying the epithelium (**Ep**) and intermingled with smooth muscle cells (**SM**). Smooth muscle cells with infolded nuclear membrane (**arrow**). Occurrence of inflammatory cells (**Ci**).

Figure 4 (a-e): Electron micrographs of the epithelial cells of ventral lobe of the prostate from nicotine group.

4a: Epithelium with cuboidal cells, intermingled with basal cells (**Bc**). Irregular shaped nuclei (**N**) and nitid nucleoli (**Nu**). Rough endoplasmic reticulum (**RER**) in the perinuclear cytoplasm. Mitochondria (**M**). Discontinuity of microvilli (**Mv**). Lumen (**L**). Stroma with smooth muscle cells (**SM**) with secretory vesicles (**arrow**), underlying the epithelium.

4b: Apical region. Discontinuity of microvilli (**Mv**). Occasional vesicles (**Vs**) with granules of different electron density. Lumen (**L**).

4c: Supranuclear region. Dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum (**RER**) and of the Golgi complex (**arrow**). Mitochondria (**M**) and vesicles (**Vs**) with flocculent and low electron density contents in the supranuclear cytoplasm.

4d: Stroma with collagen fibers (**col**) close to smooth muscle cells (**SM**), underlying the epithelium (**Ep**). Basal lamina (**arrow**).

4e: Basal region. Secretory epithelium resting on basal lamina (**arrow**). Nuclei of the epithelial cells (**N**). Mitochondria (**M**) and lipidic droplets (**asterisks**), scattered throughout basal cytoplasm. Stroma (**St**) with smooth muscle cells, with secretory vesicle (**open arrow**).

Figure 5 (a-g): Electron micrographs of the epithelial cells of ventral lobe of the prostate from nicotine-alcohol group.

5a: Secretory epithelium with cuboidal cells. Irregular nuclei (**N**) with condensed chromatin located in both periphery and around nucleoli (**Nu**). Dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum (**RER**). Golgi complex (**arrow**) and secretory vesicles (**Vs**) with flocculent and low electron density contents, concentrated in the supranuclear cytoplasm. Occasional digestory vacuoles (**dv**). Lipid droplets (**asterisc**). Lumen (**L**). Stroma with collagen fibers (**col**) and smooth muscle cells (**SM**).

5b: Apical region. Discontinuity of microvilli. Occasional vesicles (**Vs**) with granulated contents of different electron density. Dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum (**arrow**). Mitochondria (**M**). Lumen (**L**). **Inset:** Mitochondria with rupture of cristae (**arrows**) and nuclei of the epithelial cells (**N**) (X10000).

5c: Supranuclear region. Dilated cisternae of the Golgi complex (**arrows**). Vesicle (**Vs**) with flocculent and low electron density material. Lumen (**L**).

5d: Stroma with collagen fibers (**col**), dispersed around smooth muscle cells (**SM**). Smooth muscle cells showing secretory phenotype. These cells presented little secretory vesicles (**v**). Nuclei (**N**). Basal lamina (**open arrow**). **Inset:** Smooth muscle cells present spinous aspect (**arrow**) and secretory vesicle (**v**) (X7750).

5e: Epithelial cell nuclei (**N**). Rough endoplasmic reticulum (**RER**) in the basal cytoplasm. Basal lamina (**arrow**). Stroma (**St**) with large amount of collagen fibers (**col**) and blood vessels (**Bv**). Inflammatory cells (**Ci**), intermingled with fibrillar elements.

5f: Basal region. Mitochondria (**M**). Lipid droplets (**arrows**), throughout basal cytoplasm. Stroma with collagen fibers (**col**), distributed underlying the epithelium, besides inflammatory cells (**Ci**).

5g: Occurrence of prostatic intraepithelial neoplasm (**PIN**). Prostatic stroma (**St**).

Graph 1

Graph 1: Relative area (%) of the Secretory Epithelium (Ep) X Stroma (St) of the ventral lobe of the prostate in the four experimental groups.

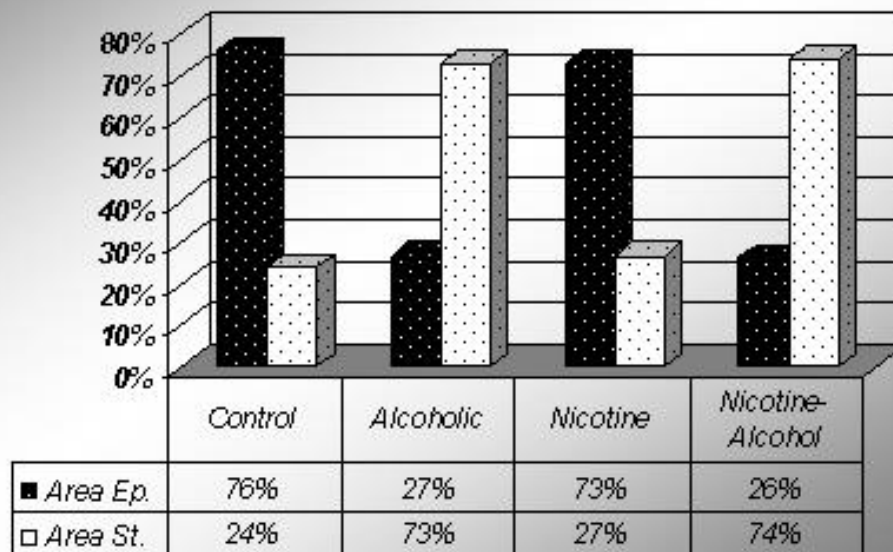


Figure 1

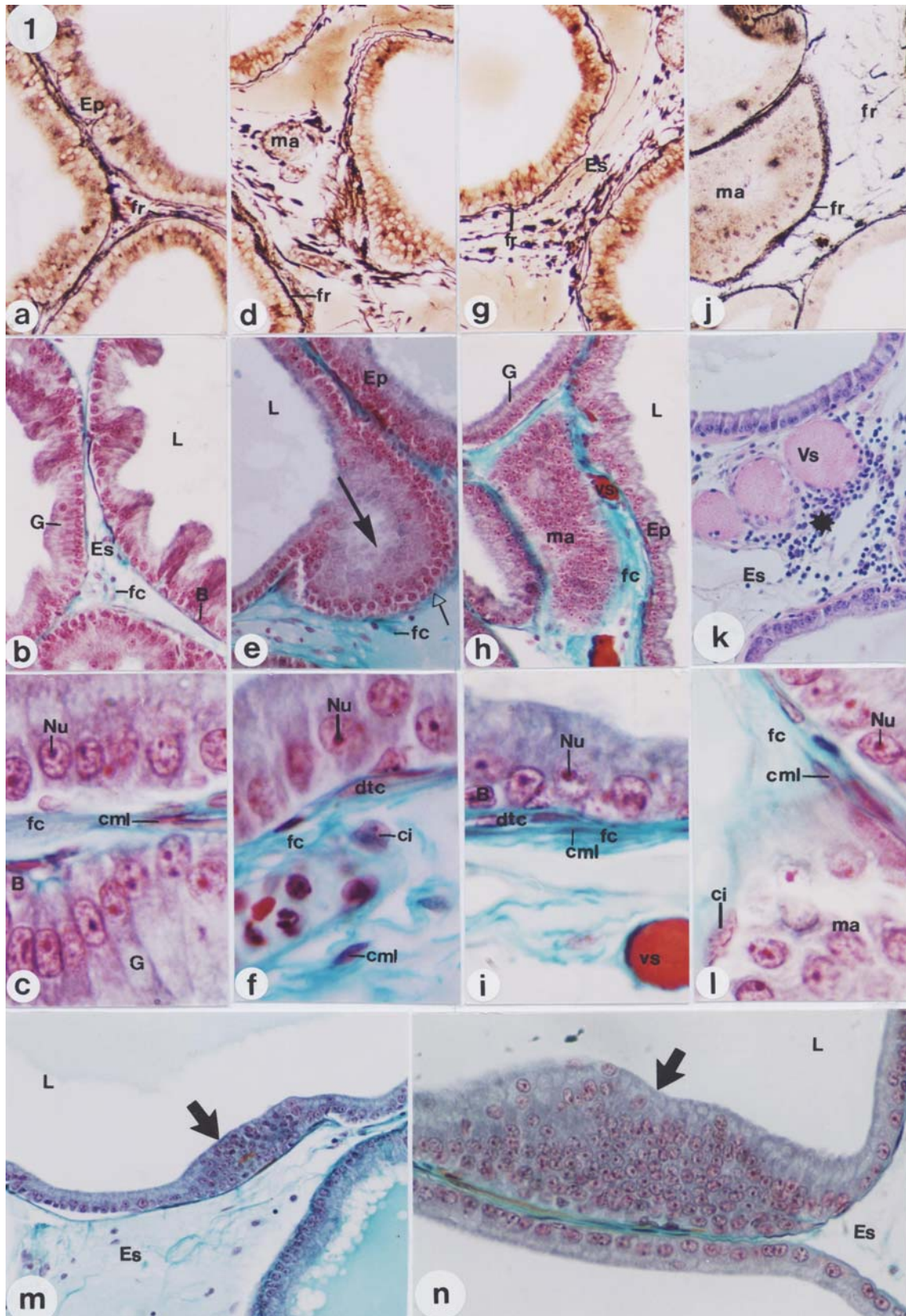


Figure 2

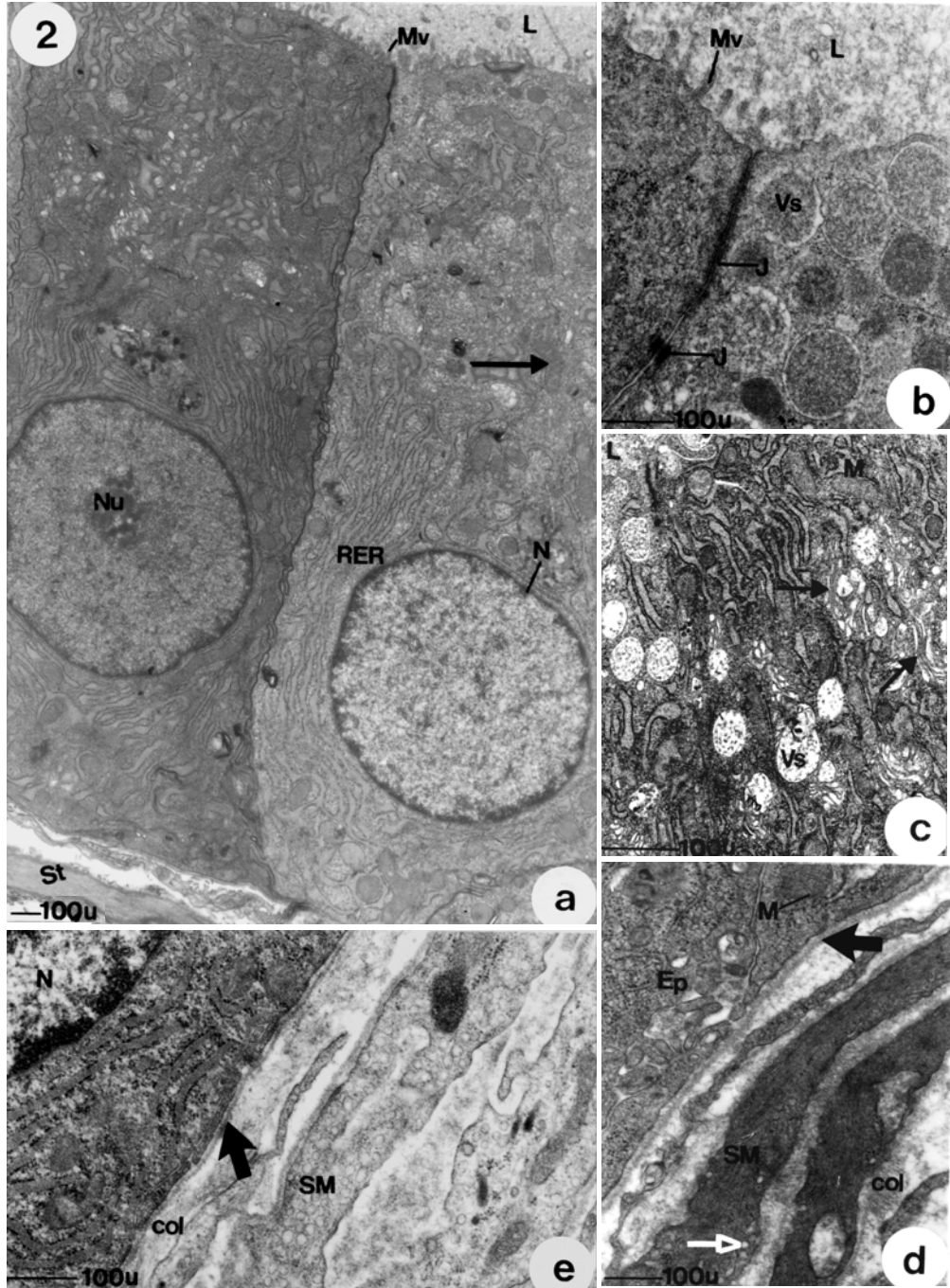


Figure 3

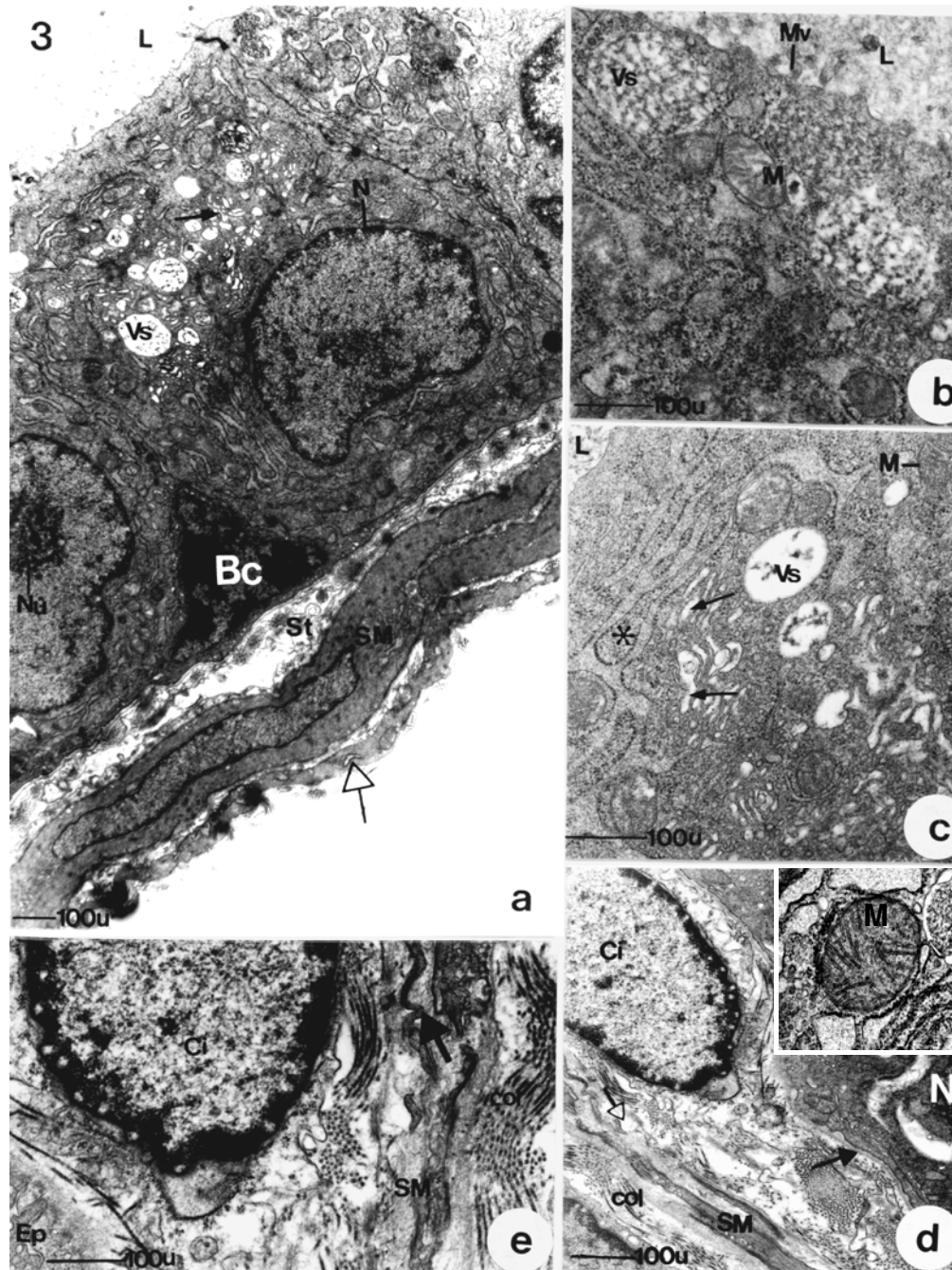


Figure 4

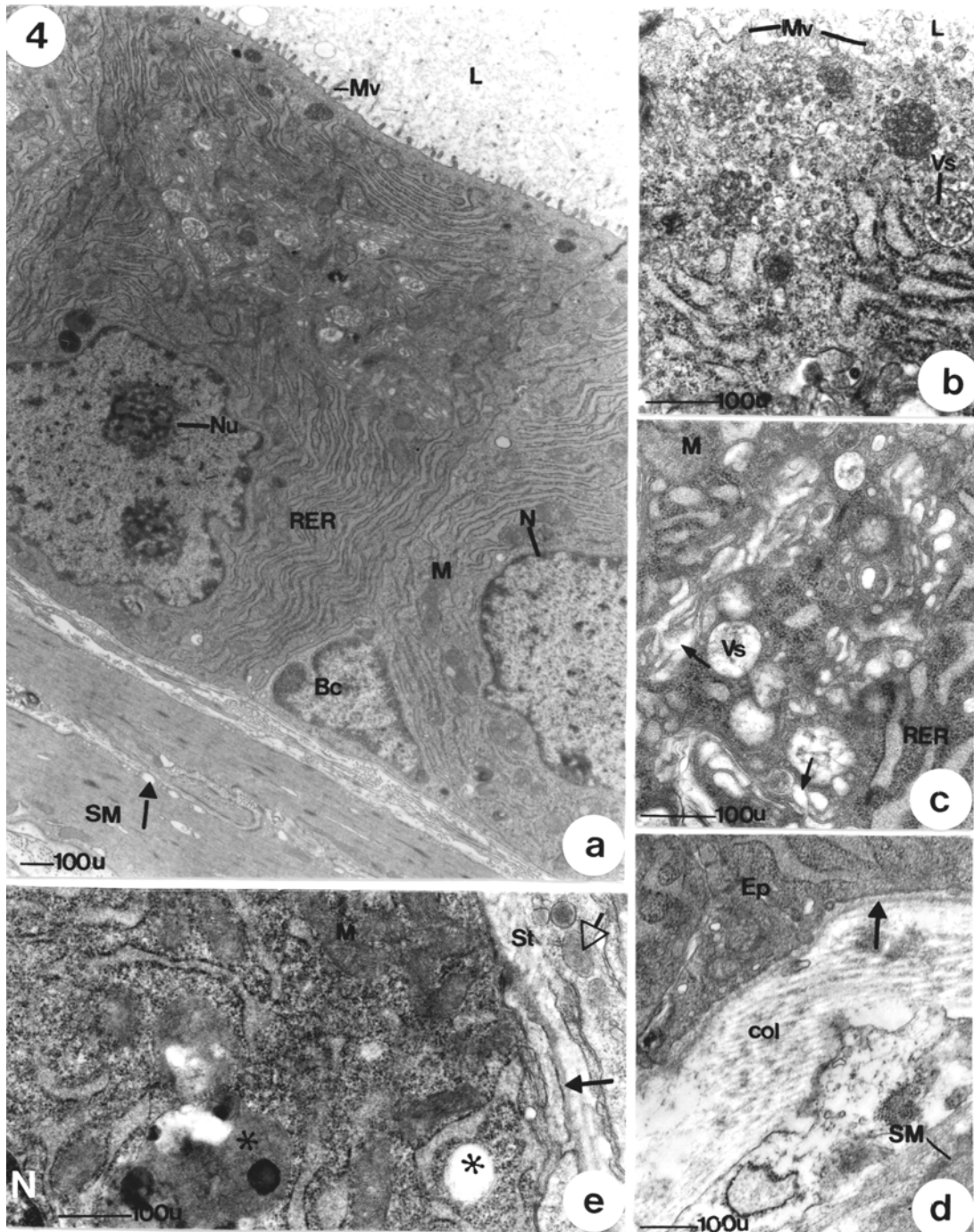
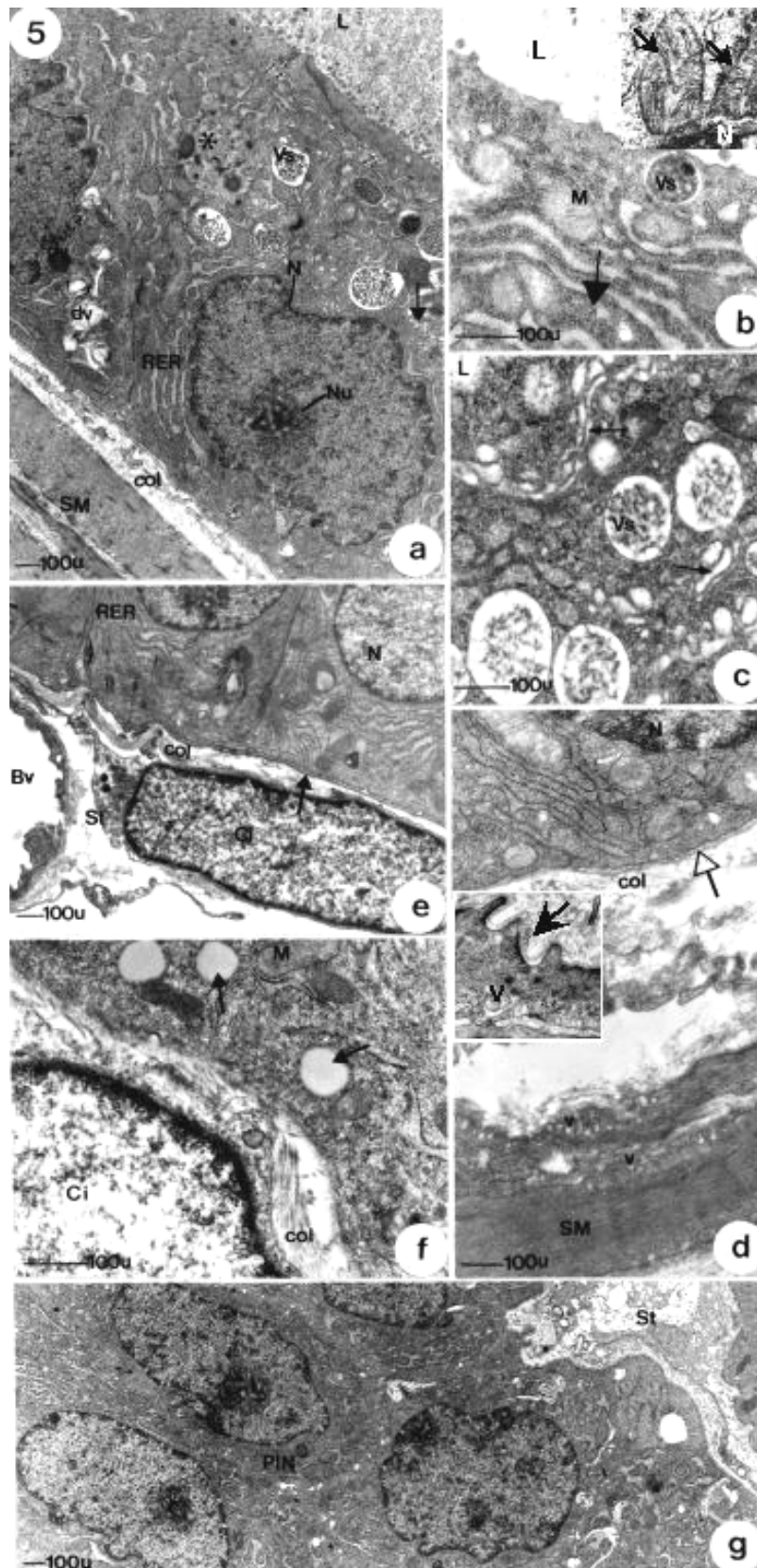


Figure 5



“Expressão dos Receptores Androgênicos e Estrogênicos α na Próstata Ventral de Ratos Submetidos ao Tratamento Crônico Simultâneo de Etanol e Nicotina”.

Fávaro, WJ¹, Cagnon, VHA¹

1 - Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil

Key words: Ventral Prostate; Nicotine; Alcohol; Immunohistochemistry; Androgen Receptor; Estrogen Receptor

Supported by CAPES.

*Correspondence to: Dr. Valéria H. A. Cagnon, Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, Box 6109, São Paulo, Brazil. Telephone: (55) 19-3788- 6102. Fax: (55) 19-3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br.

RESUMO

Os hormônios androgênicos e estrogênicos exercem importantes funções tanto na manutenção da homeostase prostática quanto na carcinogênese e progressão tumoral dessa glândula. O álcool e a nicotina são fatores extrínsecos conhecidos como prejudiciais ao funcionamento da glândula prostática. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos α frente ao uso crônico concomitante de etanol e nicotina, bem como correlacionar esses resultados ao desenvolvimento de possíveis patologias prostáticas. Um total de 40 ratos macho (*Rattus norvegicus*), com 75 dias de idade, foi dividido em quatro grupos experimentais: Grupo controle (10 animais) recebeu água *ad libitum*; Grupo alcoollista (10 animais) recebeu etanol diluído a 10% *Gay Lussac* (10% v/v) *ad libitum*; Grupo nicotina (10 animais) recebeu um total de 0,125mg/100g de peso corpóreo/diariamente de nicotina (Sigma, St. Louis, USA) por via subcutânea; Grupo nicotina-álcool (10 animais) recebeu tratamento simultâneo com etanol e nicotina, nas mesmas concentrações que nos grupos alcoollista e nicotina. Após 90 dias de tratamento, todos os animais foram sacrificados e amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas para análises imunológicas em microscópio confocal, além das dosagens hormonais. Os resultados revelaram diminuição significativa dos níveis séricos de testosterona e aumento dos níveis séricos de estrógenos nos animais dos grupos nicotina-álcool, alcoollista e nicotina em relação aos animais controles, bem como a expressão dos seus respectivos receptores. Assim, concluiu-se que o etanol e a nicotina comprometem o equilíbrio hormonal prostático, sugerindo a ocorrência da patogênese do órgão, a qual poderá ser associada a processos tardios de malignescência glandular.

INTRODUÇÃO

Andrógenos têm sido considerados como os principais hormônios esteróides sexuais envolvidos na morfogênese, na manutenção da atividade funcional, na proliferação e na diferenciação das células da glândula prostática (Leav et al., 2001; Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005). Contudo, atualmente foi estabelecido que também os estrógenos influenciam de forma efetiva os processos de crescimento normal e anormal da glândula prostática em diferentes animais, tanto durante a vida fetal como durante a vida adulta (Adams et al., 2002).

O desenvolvimento andrógeno-dependente da próstata ocorre via interações parácrinas entre epitélio e mesênquima, precursor do estroma, sendo que os receptores androgênicos mesenquimais induzem a morfogênese e a proliferação epitelial e, orienta a expressão de proteínas secretoras específicas e dos receptores androgênicos epiteliais (Cunha et al., 1992; Marker et al., 2003). Os andrógenos expressam seus efeitos biológicos através da interação com receptores intracelulares específicos, sendo que, o complexo receptor-hormônio associado à cromatina nuclear regula a expressão do gene específico (Prins et al., 1991). A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos circulantes (Toorians et al., 2003).

A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse pela enzima aromatase (citocromo P450 aromatase), expressada pelo gene Cyp19 (Fishman & Goto, 1981). Esta enzima é um regulador crítico entre o balanço de andrógenos e estrógenos, a qual contribui para o nível circulante e no tecido desses hormônios (Risbridger et al., 2003). Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desses hormônios em receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Risbridger et al., 2001; Cunha et al., 2002). Diversos estudos verificaram que respostas crônicas ou agudas dos hormônios estrogênicos são mediadas principalmente por receptores α (Prins et al., 2001; Adams et al., 2002; Weihua et al., 2002; Matthews & Gustafsson, 2003; Imamov et al., 2005; Taylor et al., 2005).

As ações independentes de andrógenos e estrógenos são capazes de alterar o crescimento normal da próstata, mas não induzem a malignescência do órgão (Bianco et al.,

2002; Risbridger et al., 2003). Contudo, tem sido evidenciado que a combinação de andrógenos e estrógenos podem induzir a displasia e mudanças pré-malignas das células prostáticas, sendo que o desequilíbrio entre esses hormônios é ponto crítico tanto na função normal da próstata quanto na deflagração de aberrantes modelos de crescimento, resultando em malignescência (Bianco et al., 2002; Risbridger et al., 2003).

A próstata é um órgão que sofre influências de diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos durante seu desenvolvimento e sua manutenção morfofuncional (Chung et al., 1997). Dentre os fatores intrínsecos destacam-se as células epiteliais, o músculo liso e a matriz extracelular que são conhecidos por influenciarem a morfogênese e a diferenciação da glândula prostática (Cunha et al., 1992). Também, fatores extrínsecos testiculares como os hormonais, que são potentes agentes mitóticos da próstata (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002; Weihua et al., 2002), além de toxinas como o etanol e a nicotina (Riesenfeld & Oliva, 1988; Reddy et al., 1998; Tadic et al., 2000), estão sendo relacionados ao desequilíbrio glandular.

O álcool e seus metabólitos, em especial o acetaldeído, provocam distúrbios generalizados em diversos sistemas orgânicos, incluindo o genital masculino (Marks & Wright, 1978; Lieber, 1988; Martinez et al., 2001; Gomes et al., 2002). É conhecido que, o etanol atua como uma toxina direta sobre as gônadas masculinas, alterando a síntese de testosterona testicular (Banister & Lowosky, 1987; Anderson et al., 1989; Saxena et al., 1990; Tadic et al., 2000) e, indireta provocando efeitos deletérios sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, com conseqüente redução na produção de andrógenos pelas células de Leydig (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Tadic et al., 2000). Em decorrência da privação androgênica pelo alcoolismo crônico, diversas alterações morfológicas nocivas afetam a glândula prostática (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Kiess & Gallaher, 1998; Tadic et al., 2000). Essas alterações incluem diminuições no tamanho e peso glandular, atrofia epitelial, queda do padrão qualitativo das proteínas secretadas e apoptose (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Kiess & Gallaher, 1998; Tadic et al., 2000). Além disso, ocorre perda da atividade proliferativa e secretora, síntese de DNA, conteúdo e complexidade do RNA e diminuição na quantidade de receptores androgênicos (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Kiess & Gallaher, 1998; Tadic et al., 2000).

A nicotina é o maior alcalóide do tabaco sendo considerada seu componente primário e responsável por muitos dos efeitos prejudiciais nos fumantes (Chinoy & Seethakshmi, 1978; Rosemberg, 1981; Chowdhury & Bromage, 2000). Além da tabaco-dependência, a nicotina altera a homeostase dos diferentes sistemas orgânicos como: cardiovascular, nervoso, endócrino e genital (Meade et al., 1987; Mjos, 1988; Zhu & Parmley, 1997; Marano, et al., 1999; Florek and Marszalek, 1999).

No sistema genital masculino, a diminuição da fertilidade é apontada como resultado da ação da nicotina nas gônadas, tanto clínica como experimentalmente (Weisberg, 1985; Florek & Marzalek, 1999). Segundo Meikle et al. (1988), a nicotina e seu metabólito, a cotinina, são inibidores da 3α -hidroxiesteróide dihidrogenase, uma enzima importante no metabolismo da testosterona e dihidrotestosterona que pode alterar a ação androgênica no tecido prostático. Também, Reddy et al. (1998) verificaram que o uso crônico de nicotina em camundongos promove redução do peso testicular e atrofia das glândulas sexuais acessórias, sendo essa última, atribuída a depleção androgênica.

As alterações provenientes do uso crônico de álcool e nicotina certamente comprometem o processo reprodutivo proveniente do desequilíbrio glandular. Ainda, o envolvimento dos hormônios androgênicos e estrogênicos durante a carcinogênese prostática e a progressão tumoral tem sido evidenciada em vários estudos clínicos e experimentais.

Dessa forma, considerando as importantes funções dos hormônios androgênicos e estrogênicos para a homeostase prostática, além das drásticas alterações morfofuncionais provenientes do uso crônico de álcool e nicotina, o presente trabalho objetivou caracterizar a expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos α frente ao uso crônico concomitante de etanol e nicotina, bem como correlacionar esses resultados ao desenvolvimento de possíveis patologias prostáticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*) com 75 dias de idade obtidos no centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo controle (10 animais) recebeu água *ad libitum*; Grupo alcoolista (10 animais) recebeu etanol diluído a 10% *Gay Lussac* (10% v/v) *ad libitum* (Martinez et al., 1997; Gomes et al., 2002); Grupo nicotina (10 animais) recebeu um total de 0,125mg/100g de peso corpóreo diariamente de nicotina (Sigma, St. Louis, USA) por via subcutânea (Riesenfeld & Oliva, 1988); Grupo nicotina-álcool (10 animais) recebeu tratamento simultâneo de etanol e nicotina, em condições similares aos grupos alcoolista e nicotina. Após os 90 dias de tratamento, todos os animais foram sacrificados, e amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas para análises imunológicas utilizando-se microscópio confocal.

Dosagens dos níveis de testosterona e estrógenos totais no plasma sanguíneo

Amostras de sangue foram obtidas de 10 animais, de cada grupo experimental, através de punção cardíaca no ventrículo esquerdo. O plasma foi separado por centrifugação, 3000 rpm (Eppendorf/ 5804R Centrifuge), com posterior mensuração das concentrações de Testosterona e Estrógenos por técnica de radioimunoensaio (Total/ Kit COAT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation Los Angeles, CA, USA).

Imunolocalização dos Receptores Androgênicos e Estrogênicos α

Amostras do lobo ventral foram coletadas de 10 animais de cada grupo experimental, com posterior embebição em meio de inclusão para baixas e médias temperaturas (Tissue-Tek, Sakura Tokyo, Japan) e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram obtidos cortes com dez micrômetros de espessura no criostato (HM 505 E Microm) à -24°C, coletados em lâminas silanizadas. À seguir, o material foi incubado em solução bloqueadora de albumina de soro bovino (3%), em tampão PBS por 1,5 hora em temperatura ambiente. Em continuidade, o material foi incubado com os anticorpos primários policlonais anti-rabbit AR-119 (sc-815), conjugado com fluoresceína (FITC) (Santa Cruz Biotchnology) para receptores androgênicos (AR) e anti-rabbit MC-

20 (sc-542) conjugado com fluoresceína (FITC) (Santa Cruz Biotchnology) para receptores estrogênicos alfa ($ER\alpha$), diluídos em solução de albumina soro bovino (3%) em tampão PBS (1 : 50) por 1,5 hora em temperatura ambiente. Finalizando, as lâminas foram montadas em DABCO (Sigma Chemical CO) com posterior análise ao microscópio Confocal (MRC 1024 UV, Bio-Rad, CA, USA), com objetiva de 40X (1.2 NA, imersão em água). Comprimento de onda de 488 nm foi usado para excitar a fluoresceína. Os parâmetros como contraste, brilho e diâmetro da íris foram ajustados e se mantiveram constantes durante todas as análises tanto do grupo controle quanto dos demais grupos experimentais. A intensidade da marcação foi graduada como intensa (+++), moderada (++) e fraca (+), de acordo com a concentração e distribuição dos receptores nos tecidos glandulares (Markopoulos et al., 2000).

Análise estatística

O estudo da comparação entre grupos foi realizado para os níveis de testosterona e estrógenos totais no plasma sanguíneo através do teste de comparações múltiplas de Tukey para comparação entre as médias (Montgomery, 1991). Todas as conclusões foram realizadas em nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Dosagens Hormonais

Os valores médios das dosagens dos níveis séricos de testosterona foram significativamente maiores no grupo controle quando comparados aos demais grupos experimentais, sendo que os grupos alcoolista e nicotina-álcool não apresentaram diferenças significativas entre si (Gráfico 1) O grupo nicotina apresentou valores médios de testosterona significativamente menores que o controle, mas significativamente maiores que os grupos alcoolista e nicotina-álcool (Gráfico 1). Já os valores médios das dosagens dos níveis séricos de estrógenos foram significativamente menores nos animais do grupo controle quando comparados aos demais grupos experimentais (Gráfico 1).

Imunolocalização dos Receptores Androgênicos e Estrogênicos α

Grupo Controle

A expressão dos receptores androgênicos foi intensa nos núcleos das células epiteliais secretoras (**Figs. 1a, 1b** e Tabela 1). Em contraste, a reação para os receptores estrogênicos α foi fraca quando comparados aos demais grupos experimentais, imunolocalizadas no estroma prostático periacinar (**Figs. 2a, 2b** e Tabela 1).

Grupo Alcoolista

A expressão dos receptores androgênicos foi fraca, embora com intensidade superior à evidenciada no grupo nicotina-álcool (**Figs. 1c, 1d** e Tabela 1). Os receptores estrogênicos α apresentaram intensa imunorreação no estroma periacinar (**Figs. 2c, 2d** e Tabela 1).

Grupo Nicotina

A expressão dos receptores androgênicos foi moderada (**Figs 1e, 1f** e Tabela 1). A imunorreação para os receptores estrogênicos α foi moderada, porém com imunoluminescência de menor intensidade em relação aos grupos alcoolista e nicotina-álcool (**Figs. 2e e 2f** e Tabela 1).

Grupo Nicotina-Álcool

A imunorreação para os receptores androgênicos foi fraca quando comparada aos demais grupos experimentais (**Figs. 1g, 1h** e Tabela 1). Os receptores estrogênicos α expressaram-se de forma intensa em relação aos demais grupos experimentais (**Figs. 2g, 2h** e Tabela 1).

DISCUSSÃO

As dosagens hormonais revelaram diminuição significativa dos níveis séricos de testosterona e aumento dos níveis séricos de estrógenos nos animais dos grupos nicotina-álcool, alcoolista e nicotina em relação aos animais controles. Também, observou-se que a relação testosterona/ estrógenos foi diminuída nos grupos nicotina-álcool, alcoolista e

nicotina em relação ao controle. A expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos α seguiu a mesma orientação dos grupos verificados para os níveis hormonais séricos. Estudos fisiológicos demonstraram a ocorrência de redução dos níveis séricos de testosterona em animais submetidos à ingestão de variadas dosagens alcoólicas, além de alterações morfológicas nocivas sobre a glândula prostática, sendo essas alterações atribuídas tanto à ação direta do etanol sobre os tecidos prostáticos quanto indireta, através do desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Van Thiel & Lester, 1979; Kubo et al., 1998; Wang et al., 1999; Tadic et al., 2000). A redução do conteúdo de andrógenos no plasma sanguíneo pelo alcoolismo crônico leva à redução do número de receptores androgênicos, de modo que a quantidade total desses receptores é diretamente proporcional aos níveis de andrógenos (Van Thiel & Lester, 1979; Salomen & Huhtaniemi, 1990; Purohit, 2000). Em adição, Meikle et al. (1988) demonstraram que a indução de nicotina em cães também promoveu modificações morfofisiológicas da próstata tanto pela ação direta como também pelo desequilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal acarretando em diminuição dos níveis de testosterona no sangue. Além disso, sugeriram que a nicotina e a cotinina são inibidores competitivos da enzima 3α -hidroxiesteróide dihidrogenase (HSD), uma importante enzima envolvida no metabolismo da dihidrotestosterona (DHT) e que está diretamente associada a homeostase prostática.

A literatura relata que a privação androgênica compromete a expressão de seus receptores, dificultando a ligação receptor-hormônio, além de diminuir as atividades das enzimas hepáticas de metabolização de estrógenos, as quais são dependentes de andrógenos (Saxena et al., 1999; Wright et al., 1996; Tadic et al., 2000). Tadic et al. (2000) verificaram que a diminuição das atividades das enzimas hepáticas de metabolização de estrógenos promoveu alterações no balanço testosterona/ estrógenos e conseqüente elevação dos níveis séricos de estrógenos no plasma sanguíneo de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental. Também, Asano et al. (2003) caracterizaram que elevados níveis de testosterona levaram a diminuição dos níveis séricos de estrógenos e da expressão dos receptores estrogênicos α . Os mesmos autores demonstraram que o tratamento com 17-beta estradiol e/ ou em associação com a castração elevaram os níveis séricos de estrógenos e dos receptores estrogênicos α no RNA mensageiro das células da glândula prostática de

ratos submetidos à reposição de testosterona e estrógenos em diferentes fases do desenvolvimento.

Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver tanto ações diretas, através dos receptores, como indiretas, através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Cunha et al., 2002). Os efeitos diretos dos estrógenos são de difícil determinação uma vez que esses, na administração de estrógeno exógeno, são mediados pelo sistema nervoso central e rompem o equilíbrio hormonal normal. Tal ruptura, leva à inibição do *feedback* negativo da produção de gonadotrofinas endógenas e à depressão da biossíntese de testosterona testicular (Walsh, 1975; Cunha et al., 2002).

Recentemente, as ações diretas dos estrógenos na próstata foram avaliadas através de um modelo de camundongos hipogonadal (hpg), os quais têm deficiência pós-natal em gonadotrofinas e testosterona, mas são sensíveis a hormônios. Nesse estudo, verificou-se resposta proliferativa direta ao estrógeno nos lobos ventral e anterior da próstata e vesícula seminal desses animais. Tais resultados foram demonstrados através de proliferação de fibroblastos no estroma e metaplasia das células epiteliais basais, além de processo inflamatório (Bianco et al., 2002). Contudo, os autores destacaram que a resposta direta estrogênica é influenciada por outras variáveis como a dosagem administrada, tempo de exposição e a presença de andrógenos (Bianco et al., 2002).

Reciprocamente, estudo utilizando camundongos estrógeno-modulado, os quais eram *Knockout* para enzima aromatase, demonstrou que doses elevadas de andrógenos têm efeitos morfológicos similares a doses elevadas de estrógenos. Os resultados exibiram doses periféricas e intraprostáticas elevadas de andrógenos, aumento dos receptores androgênicos, além da expansão dos volumes dos compartimentos estromal, epitelial e luminal indicando efeito proliferativo glandular (Jarred et al., 2002). Assim sendo, esses trabalhos evidenciaram que tanto os estrógenos como andrógenos são elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes caminhos.

Estudos com ratos neonatais demonstraram que durante o desenvolvimento, o *imprinting* estrogênico resulta em múltiplas mudanças no crescimento morfológico prostático, além de reduzir a sensibilidade à exposição de andrógenos na vida adulta, o qual inclui a aceleração da degradação dos receptores androgênicos prostáticos (Prins et al;

1991; Jarred et al., 2000). Também, outros efeitos da estrogenização na próstata levaram a ocorrência de atipia celular ao avançar da idade, processo inflamatório, hiperplasia epitelial e a emergência de lesões displásicas (Jarred et al., 2002; Bianco et al., 2002). Também, Prins et al. (2001), em um experimento com camundongos estrógeno-modulado, deficientes para receptores α ou β , verificaram que as respostas crônicas ou agudas provenientes da estrogenização no desenvolvimento são mediadas principalmente por receptores α . Os autores ainda sugeriram que, o receptor β não é requerido nessas ações, ou seu papel pode ser considerado de menor importância no processo. Contudo, estudos envolvendo os ER β estrogênicos tem adicionado mais um nível de complexidade nos mecanismos de ações dos estrógenos na próstata (Weihua et al., 2002).

Atualmente, a importância dos hormônios androgênicos e estrogênicos tem sido demonstrada no desenvolvimento de patologias prostáticas a partir de estudos clínicos e experimentais (Marcelli & Cunningham, 1999; Cunha et al., 2002; Tuxhorn et al., 2002; Risbridger et al., 2003). Várias hipóteses têm sido correlacionadas à manifestação do carcinoma prostático. Estudos epidemiológicos consideram os hormônios estrogênicos como tendo papel vital na carcinogênese prostática (Montie & Pienta, 1994). É conhecido que, excessiva exposição aos estrógenos em diferentes etapas do desenvolvimento pode levar à neoplasia prostática (Weihua et al., 2001). Walsh & Wilson (1976) confirmaram a relação estrógenos e andrógenos usando um modelo canino e demonstraram que os estrógenos podem causar o desenvolvimento de hiperplasia glandular.

Segundo Bianco et al. (2002) e Risbridger et al. (2003), estudando experimentalmente as ações de andrógenos e estrógenos verificaram que as atuações independentes de andrógenos e estrógenos têm potencial para iniciar mudanças na próstata, incluindo a hiperplasia e displasia, mas não a malignescência no órgão. Por outro lado, como esses dois hormônios agem em sinergismo para induzir a carcinogênese não é conhecido (Bianco et al., 2002).

À partir dos resultados obtidos concluiu-se que fatores extrínsecos como o etanol e a nicotina, individualmente, levaram a ruptura hormonal da homeostase da glândula prostática, caracterizada por alterações nas taxas testosterona/ estrógenos e conseqüente modificação do padrão de expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos,

desequilíbrio esse que é intensificado na associação dessas drogas. Além disso, tanto individualmente como a associação dessas drogas, certamente elevam o risco de patologias prostáticas, predispondo o órgão à processos tardios de malignescência glandular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho SM, Pfuenger SM (2002) Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate* 52: 69-81.
- Anderson Jr RA, Philips JF, Zaneveld LJD (1989) Chronic ethanol ingestion during puberty alters the transient increase in testicular 5 α -reductase in the Swiss-Webster mouse. *J Androl* 10: 28-36.
- Asano K, Maruyama S, Usui T, Fujimoto N (2003) Regulation of estrogen receptor alpha and beta expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocr J* 50: 281-7.
- Bannister P, Lowosky MS (1987) Ethanol and hypogonadism. *Alcohol* 22: 213-7.
- Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP (2002) Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinol* 143: 4922-4933.
- Chinoy NJ, Seethakshmi L (1978) Effects of drugs on the reproductive physiology of male albino rats: Part II – Nicotine & morphine. *Indian J Exp Biol* 16: 323-325.
- Chowdhury IG, Bromage TG (2000) Effects of fetal exposure to nicotine on dental development of the laboratory rat. *Anat Rec* 258: 397-405.
- Chung L, Kozlowski JM, Grayhack JT (1997) Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 31: 131-138.
- Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour AA, Boutin EL, Foster BA (1992) Normal and abnormal development of the male urogenital tract. role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl* 13: 465-475.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ (2002) Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70: 473-485.

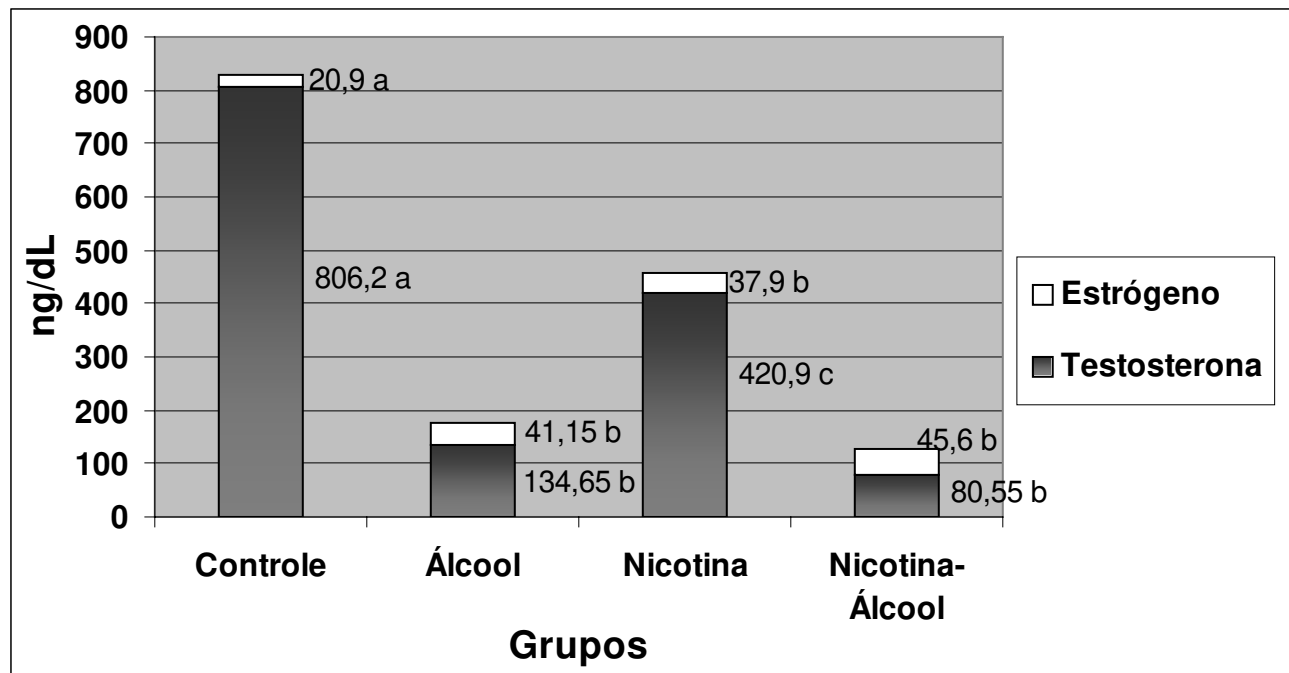
- Fishman J, Goto J (1981) Mechanism of estrogen biosynthesis. Participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. *J Biol Chem* 256: 4466-4471.
- Florek E, Marszalek A (1999) An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Hum Exp Toxicol* 18: 272-278.
- Gomes IC, Cagnon VH, Carvalho CA, De Luca IM (2002) Stereology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell* 34: 177-186.
- Imamov O, Shim GJ, Warner M, Gustafsson JA (2005) Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol Reprod* 73: 866-871.
- Jarred RA, Cancilla B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridger GP (2000) Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology* 141: 3471-3477.
- Jarred RA, McPherson, SJ, Bianco JJ, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP (2002) Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol Metab* 13:163-168.
- Kiess W, Galaher B. (1998) Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 138: 482-91.
- Kubo M, Uchiyama H, Ueno A, Terada N, Fuji Y, Baba T, Ohno S (1998) Three-dimensional ultrastructure of apoptotic nuclei in rat prostatic epithelial cells revealed by a quick-freezing and deep-etching method. *Prostate* 35: 193-202.
- Leav I, Lau KM, Adams JA, McNeal, JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM (2001) Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol* 159: 79-92.
- Lieber CS (1988) Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem Soc Trans* 16: 241-247.
- Marano G, Ramirez A, Mori I, Ferrari AU (1999) Sympathectomy inhibits the vasoactive effects of nicotine in conscious rats. *Cardiovasc Res* 42: 201-205.
- Marcelli M, Cunningham G (1999) Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3463-3468.

- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003) Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. *Develop Biol* 253: 165-174.
- Markopoulos AK, Pouloupoulos AK, Kayavis I, Papanayotou P (2000) Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Dis* 6: 31-34.
- Marks V, Wright J (1978) Metabolic effects of alcohol. *Clin Endocrinol Metab* 7: 245-466.
- Martinez FE, Garcia PJ, Padovani CR, Cagnon VHA, Martinez M A (1997) Morphometric ultrastructural study of the seminal vesicle of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol* 29: 537-542.
- Martinez FE, Laura IA, Padovani CR, Bustos-Obregon E (2001) Morphology of the ventral lobe of the prostate and seminal vesicles in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UchB). *J Submicrosc Cytol Pathol* 33: 99-106.
- Matthews J, Gustafsson JA (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3: 281-292.
- Meade TW, Imeson J, Stirling Y (1987) Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet* 31: 986-988.
- Meikle AW, Liu XH, Taylor GN, Stringham JD (1988) Nicotine and cotinine effects on 3 alpha hydroxysteroid dehydrogenase in canine prostate. *Life Sci* 43: 1845-1850.
- Mjos OD (1988) Lipid effects of smoking. *Am Heart J* 115: 272-275.
- Montgomery DC (1991) Design and analysis of experiments. John Wiley, New York, p 649.
- Montie JE, Pienta KJ (1994) Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology* 43: 892-899.
- Prins GS, Birsch L, Greene GL (1991) Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129: 3187-3199.
- Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS (2001) Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen

- receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res* 61: 6089-6097.
- Purohit V. (2000) Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. *Alcohol* 22(3):123-127.
- Reddy S, Londonkar R, Patil SB (1998) Testicular changes due to graded doses of nicotine in albino mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 42: 276-280.
- Riesenfeld A, OLIVA H (1988) Effects of nicotine on the fertility, cytology and life span of male rats. *Acta Anat* 131:171-176.
- Risbridger G, Wang H, Young P, Kurita T, Wang YZ, Lubahn D, Gustafsson JA, Cunha GR, Wong YZ (2001) Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol* 23: 289.
- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mcpherson SJ. (2003) Oestrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 10: 187-191.
- Rosemberg J (1981) *Tabagismo, sério problema de Saúde Pública*. Ed. da Universidade de São Paulo, Almed, p 370.
- Salonen I, Huhtaniemi I (1990) Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat. *Biol Reprod* 42: 55-62.
- Saxena S, Meehan D, Coney P, Wimalasena J (1990) Ethanol has direct inhibitory effects an steroidogenesis in human granulosa cells: specific inhibition of LH action. *Alcohol Clin Exp Res* 14: 522-527.
- Tadic SD, Elm MS, Subbotin VM, Eagon PK (2000) Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. *Hepatology* 31: 1135-1140.
- Taylor RA, Cowin P, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP. (2005) 17 β -estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER α or ER β . *Endocrinology* 13: 1-53.
- Toorians AW, Kelleher S, Gooren LJ, Jimenez M, Handelsman DJ (2003) Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5207-5211.

- Tuxhorn JÁ, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang, TD, Rowley DR (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8: 2912-2923.
- Van Thiel D H, Lester R (1979) The effect of chronic alcohol abuse on sexual function *Clin Endocrinol Metab* 8: 499-510.
- Walsh PC (1975) Physiologic basis for hormonal therapy in carcinoma of the prostate. *Urol Clin North Am* 2:125-131.
- Walsh PC, Wilson JD (1976) The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. *J Clin Invest* 57:1093-1097.
- Wang YJ, Wu JC, Lee SD, Tsay YT, Lo KJ (1999) Gonadal dysfunction and changes in sex hormones in postnecrotic cirrotic men: a matched study with alcoholic cirrotic men. *Hepato-Gastroenterol* 38: 531-534.
- Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Gustafsson JA (2001) A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 98: 6330-6335.
- Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA (2002) Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* 193: 1-5.
- Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS (1996) Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest* 98: 2558-2563.
- Weisberg E (1985) Smoking and reproductive health. *Clin Reprod Fertil* 3: 175-186.
- Zhu BQ, Parmley WW (1997) Hemodynamic and vascular effects of active and passive smoking. *Am Heart J* 130: 1270-1275.

Gráfico 1: Dosagens de Testosterona e Estrógenos totais no plasma sanguíneo (ng/dL) de ratos nos diferentes grupos.



OBS: Duas médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si ($P > 0.05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 1: Intensidade da marcação de acordo com a concentração e distribuição dos receptores nos tecidos glandulares.

Receptores	Grupos			
	Controle	Alcoolista	Nicotina	Nicotina-Álcool
AR	+++	+	++	+
ER α	+	+++	++	+++

Intensa (+++), Moderada (++), Fraca (+)

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Lobo ventral prostático. Imunolocalização dos receptores androgênicos.

1a e 1b: Grupo Controle: Expressão intensa dos receptores androgênicos (**setas**) na membrana nuclear das células do epitélio secretor (**Ep**). Estroma (**Es**).

1c e 1d: Grupo Alcoolista: Fraca expressão dos receptores androgênicos (**setas**) nos núcleos das células do epitélio secretor (**Ep**). Estroma (**Es**).

1e e 1f: Grupo Nicotina: Expressão moderada dos receptores androgênicos (**setas**). Epitélio secretor (**Ep**). Estroma (**Es**).

1g e 1h: Grupo Nicotina-Álcool: Imunorreação fraca dos receptores androgênicos na membrana nuclear das células do epitélio secretor (**Ep**). Estroma (**Es**).

Figura 2: Lobo ventral prostático. Imunolocalização dos receptores estrogênicos α .

2a e 2b: Grupo Controle: Fraca expressão dos receptores estrogênicos α no estroma prostático periacinar (**Es**) (**setas**). Epitélio secretor (**Ep**).

2c e 2d: Grupo Alcoolista: Imunorreação intensa dos receptores estrogênicos α no estroma glandular (**Es**) (**setas**). Epitélio secretor (**Ep**).

2e e 2f: Grupo Nicotina: Expressão moderada dos receptores estrogênicos α no estroma prostático (**Es**) (**setas**). Epitélio secretor (**Ep**).

2g e 2h: Grupo Nicotina-Álcool: Intensa imunorreação dos receptores estrogênicos α no estroma periacinar (**Es**) (**setas**). Epitélio secretor (**Ep**).

Figure 1

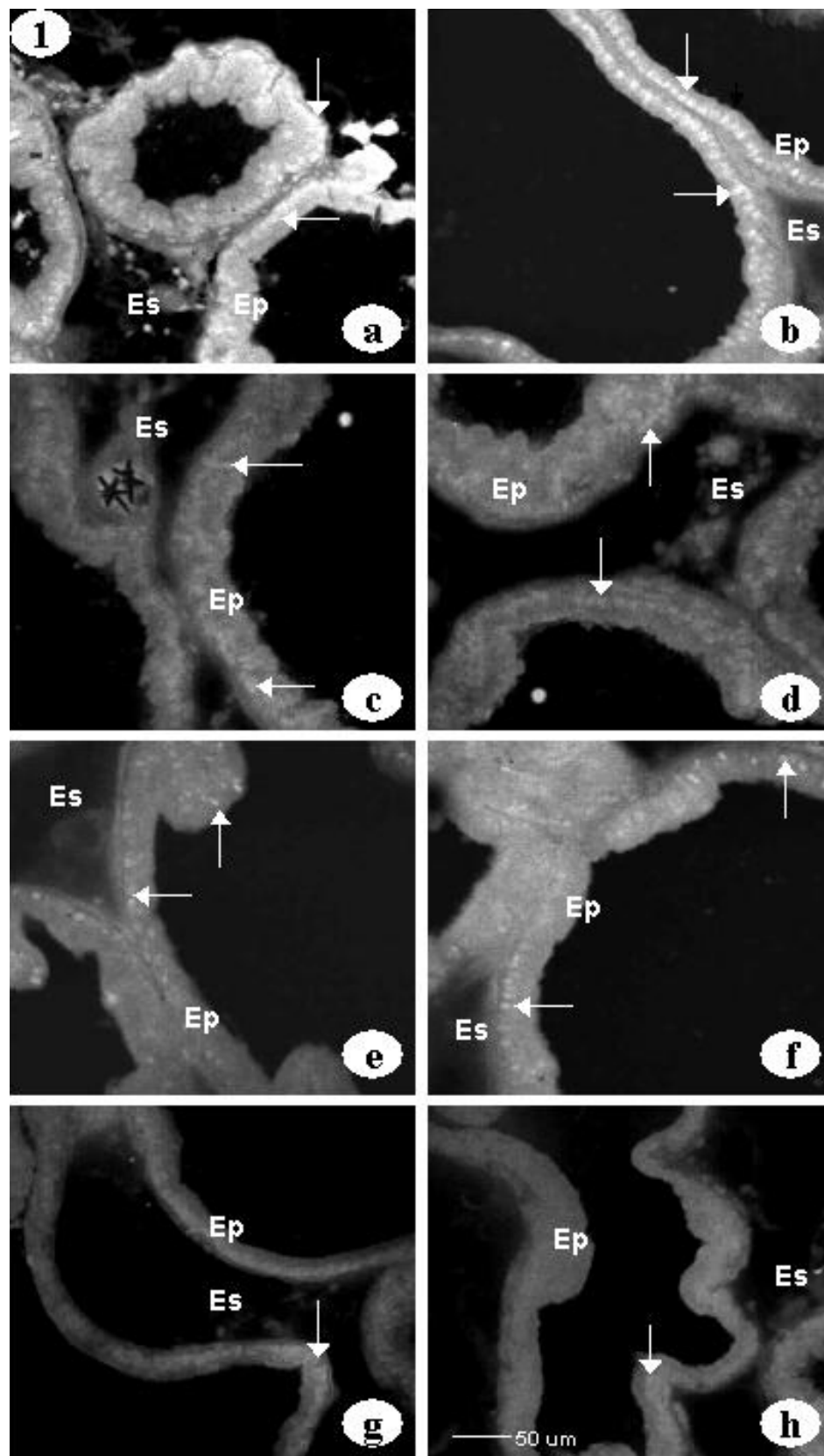
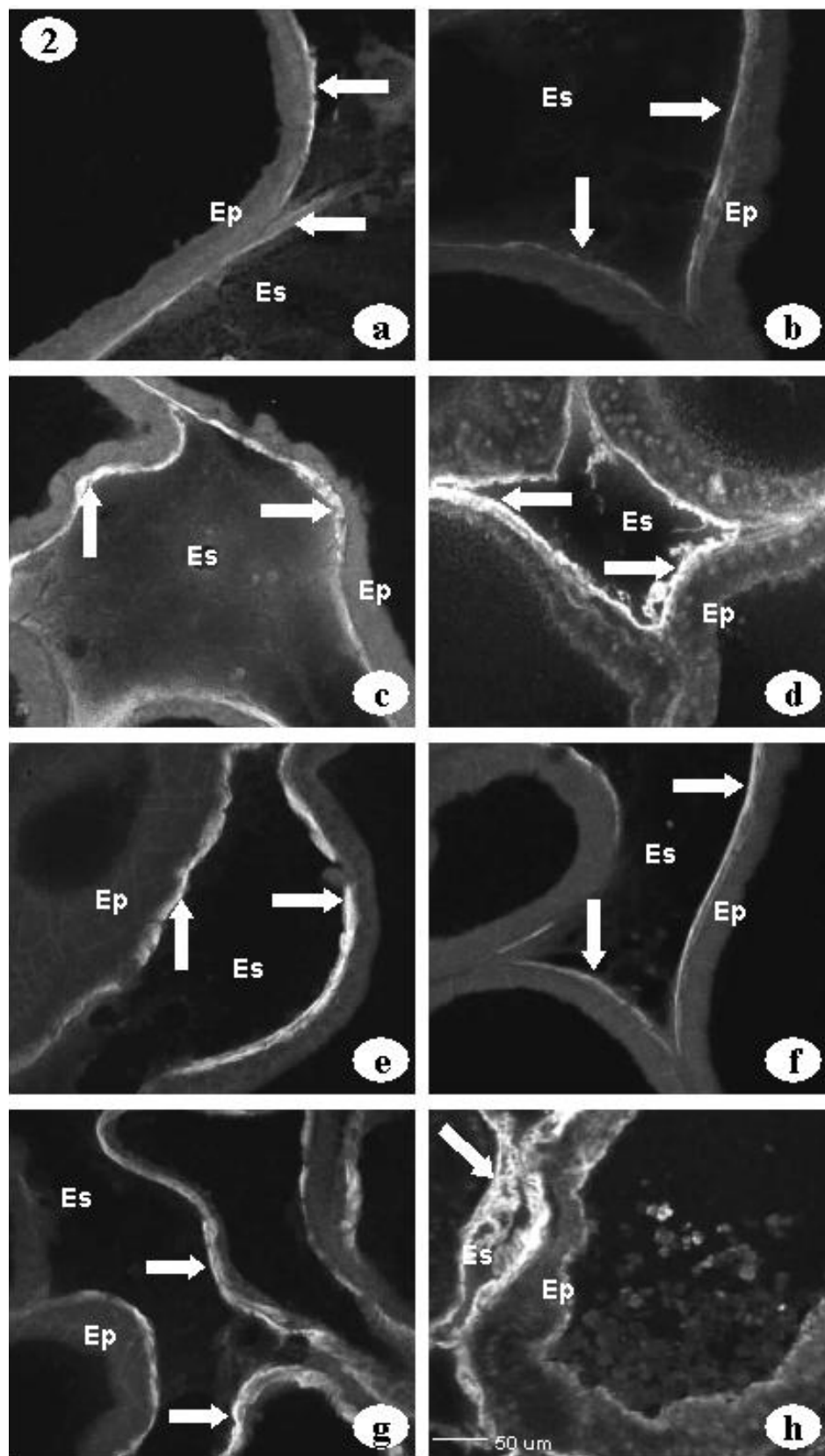


Figure 2



V- CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES FINAIS

- 1) Os animais experimentais ingeriram quantidades adequadas de energia para o desenvolvimento e manutenção de suas necessidades corpóreas, mostrando que as alterações ocorridas foram provenientes do consumo étlico e da administração de nicotina durante o período experimental.
- 2) O etanol isoladamente ou em associação à nicotina diminuiu os pesos corpóreos, das gônadas e as glândulas sexuais acessórias, sendo que a ação isolada da nicotina, embora prejudique estes, mostrou-se menos agressiva que o etanol.
- 3) O tratamento crônico de etanol e nicotina e a associação dessas drogas promoveram alterações morfológicas marcantes nos compartimentos epitelial e estromal prostático. Contudo, essas alterações foram de menor severidade no grupo nicotina. Certamente, tanto o etanol quanto a nicotina, bem como a associação dessas prejudicaram a fertilidade masculina.
- 4) O etanol individualmente ou em associação à nicotina diminuiu os níveis séricos de testosterona e elevaram os níveis séricos de estrógenos com concomitante modificação do padrão de expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos. Assim, concluiu-se que tais alterações hormonais contribuíram na ocorrência dos processos de atrofia epitelial e hipertrofia estromal dos animais experimentais.
- 5) A associação do etanol e da nicotina atua sinergicamente no desequilíbrio hormonal, comprometendo a homeostase glandular.

- 6) O etanol e nicotina são componentes efetivos no comprometimento estrutural e hormonal da glândula prostática, podendo acarretar a patogênese do órgão, o que sugere processos tardios de malignescência glandular.

VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE-SHEM, C.; SHEM, M.M. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.*, v.14, p.2410-2434, 2000.

ABEL, ER. *Marihuana, tobacco, alcohol, and reproduction*. Boca Raton, FL: CRC Pres Inc., 1983.

ANDERSON, Jr R.A.; PHILIPS, J.F; ZANEVELD, L.J.D. Chronic ethanol ingestion during puberty alters the transient increase in testicular 5 α -reductase in the Swiss-Webster mouse. *J. Androl.*, v.10, p.28-36, 1989.

ASANO, K.; MARUYAMA, S.; USUI, T.; FUJIMOTO, N. Regulation of estrogen receptor alpha and beta expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocr. J.*, v.50, p.281-287, 2003.

AUMÜLLER, G.; ADER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res.*, v.198, p.145-158, 1979.

AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex gland. *Int. Rev. Citol.*, v.121, p.127-231, 1990.

AYDOS, K.; GUVEN, M.C.; CAN, B.; ERGUN, A. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. *BJU Int.*, v.88, n.6, p.622-626, 2001.

BANDERAS, J. A.; GAITAN, L. A.; PORTILLA, J.; AGUIRRE, A. Effects of chronic ethanol consumption on the rat. *Arch. Bras. Biol.*, v.37, p.69-72, 1992.

BANNISTER, P.; LOWOSKY, M.S. Ethanol and hypogonadism. *Alcohol*, v.22, p.213-217, 1987.

BATEL, P.; PESSIONE, F.; MAITRE, C.; RUEFF, B. Relationship between alcohol and tobacco dependence among alcoholics who smoke. *Addiction*, v.90, p.977-980, 1995.

BLANDY, J.P.; LYTTON, B. What is the prostate? *Comp. Anat.*, v.3, p.1-11, 1986.

BLOMQVIST, O.; ERICSON, M.; JOHNSON, D.H.; ENGEL, J.A.; SODERPALM, B. Voluntary ethanol intake in the rat: effects of nicotinic acetylcholine receptor blockade or subchronic nicotine treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, v.314, p.257-267, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus: banco de dados. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: 20/ dez/2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Prevenção e Detecção: Tabagismo e Saúde. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/inca>. Acesso em: 20/ dez/2005.

BULL, H.; MURRAY, P.G.; THOMAS, D.; FRASER, A.M.; NELNOS, D.N. Demytified Acid phosphatases. *J Clin Pathol.*, v.55, p.65-72, 2001.

CAGNON, V.H.A.; GARCIA, P.J.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R. Ultrastructural study of the coagulating gland of wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *Prostate*, v.28, p.341-346, 1996.

CAGNON, V. H. A.; GARCIA, P. J.; GUAZELLI FILHO, J.; MARTINEZ, F.E., MELLO JR., W.; MARTINEZ, M. Ultrastructural study of the lateral lobe of the prostate of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.30, n.1, p.77-84, 1998.

CAGNON, V.H.A.; TOMAZINI, F.M.; GARCIA, P.J.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57Bl/6J) submitted to chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell*, v.33, n.4, p.354-360, 2001.

CHAIEB, J.A.; CASTELLARIN, C. Associação tabagismo-alcoolismo: introdução às grandes dependências humanas. *Rev. Saúde Pública*, v.32, n.3, p.246-254, 1998.

CHINOY, N.J. & SEETHAKHSMI, L. Effects of drugs on the reproductive physiology of male albino rats: Part II – Nicotine & morphine. *Indian J. Exp. Biol.*, v.16, n.3, p.323-325, 1978.

CHOWDHURY, I.G.; BROMAGE, T.G. Effects of fetal exposure to nicotine on dental development of the laboratory rat. *Anat. Rec.*, v.258, n.4, p.397-405, 2000.

CICERO, T. J.; BADGER, T. M. Effects of alcohol on the hypothalamic- pituitary-gonadal axis in the male rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.201, n.2, p.427-433, 1977.

CORNELL, R.J.; ROWLEY, D.; WHELLER, T.; ALI, N.; AYALA, G. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology*, v.61, p.870-875, 2003.

CUNHA, G.R.; RISBRIDGER, G.; WANG, H.; YOUNG, P. Evidence that epithelial mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Develop Biol.*, v.229, p.432-442, 2001.

CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*, v.70, p.473-485, 2002.

CUNHA, G.R.; MATRISIAN, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*, v.70, p.469-472, 2002.

DAVIES, P.; EATON, L C. Regulation of prostate growth (Review). *J Endocrinol.*, v.131, p.5-17, 1991.

DHAWAN, K.; SHARMA, A. Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libido, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linneaus in healthy male rats. *Life Sci.*, v.71, n.26, p.3059-3069, 2002.

DIFRANZA, J.R.; GUERRERA, M.P. Alcoholism and smoking. *J. Stud. Alcohol*, v.51, p.130, 1990.

DROLLER, M.J. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol.*, v.79, Suppl. 2, p.42-52, 1997.

EKMAN, P. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate*, Suppl. 10, p.14-18, 2000.

ELLINGSTAD, TP; SOBELL, LC; SOBELL, MB; et al. Alcohol abusers who want to quit smoking: implications for clinical treatment. *Drug Alcohol Depend.*, v.54, n.3, p.259-265, 1999.

FISHMAN, J.; GOTO, J. Mechanism of estrogen biosynthesis. Participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. *J. Biol Chem.*, v.256, n.9, p.4466-4471, 1981.

FLOREK, E. & MARSZALEK, A. An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Hum. Exp. Toxicol.*, v.18, n.4, p.272-278, 1999.

GARCIA, P.J.; CAGNON, V.H.A.; MELLO JR., W.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E. Ultrastructural observations of the dorsal lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *Rev. Chil. Anat.*, v.17, n.2, p.153-159, 1999.

GARRAWAY, L.A.; LIN, D.; SIGNORETTI, S.; WALTREGNY, D.; BHATTACHARYA, N.; LODA, M. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate*, v.55, p.206-218, 2003.

GOMES, I.C.; CAGNON, V.H.; CARVALHO, C.A.; DE LUCA, I.M. Stereology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell*, v.34, n.3, p.177-186, 2002.

GRIFFITHS, R.R.; BIGELOW, G.E.; LIEBSON, I. Facilitation of human tobacco self-administration by ethanol: a behavioral analysis. *J. Exp. Anal. Behav.*, v.25, p.279-292, 1976.

GUESS, H.A. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol. Rev.*, v.23, p.152-158, 2001.

HAYWARD, S.W.; CUNHA, G.R. The prostate: development and physiology. *Radiol. Clin. North Am.*, v.38, p.1-14, 2000.

HÉBERT, R. What's new in nicotine & tobacco research? *Nicotine Tob. Res.*, v.2, p.313-315, 2000.

HSING, AW; MCLAUGHLIN, JK; HRUBEC, Z; BLOT, WJ; FRAUMENI JR, JF. Tobacco use and prostate cancer: 26-year follow-up of us veterans. *Am. J. Epidemiol.*, v.133, n.5, p.437-441, 1991.

JESIK, C.J.; HOLLAND, J.M; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate*, v.3, p.81-97, 1982.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem.*, v.11, p.447-455, 1979.

KALANT, H. Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: Effects on biological membranes. *Biol. Alcohol Biochem.*, v.1, p.1-62, 1983.

KARNOVSKY, M.J. The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by coupled peroxidatic oxidation. *J. Histochem. Cytochem.*, v.13, n.7, p.604-605, 1965.

KIESS, W.; GALAHER, B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur. J. Endocrinol.*, v.138, n.5, p.482-491, 1998.

KLEIBER, E.L.; BROVERMAN, D.M.; DALEN, J.E. Serum estradiol levels in male cigarette smokers. *Am. J. Med.*, v.77, p.858-862, 1984.

KNOX, J.D.; CRESS, A.E.; CLARK, V.; MANRIQUEZ, L.; AFFINITO, K.S.; DALKIN, B.L.; NAGLE, R.B. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am. J. Pathol.*, v.145, p.167-174, 1994.

KOZLOWSKI, L.T; HENNINGFIELD, J. E.; KEENAN, R.M.; LEI, H. LEIGH, G. Patterns of alcohol, cigarette, and caffeine and other drug use in two drug abusing populations. *J. Subst. Abuse Treat.*, v.10, p.171-179, 1993.

KREIS, T.; VALE, R. *Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*. New York: Oxford University Press, p.1999.

LEAVI, I.; LAU, K.M.; ADAMS, J.A.; MCNEAL, J.E.; TAPLIN, M.E.; WANG, J.; SINGH, H.; HO, S.M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am. J. Pathol.*, v.159, n.1, p.79-92, 2001.

LIN, C.Q.; BISSEL, M.J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *Faseb*, v.7, p.737-743, 1993.

LONDONKAR, R.L.; SRINIVASREDDY, P.; SOMANATHEDDY, P.; PATIL, S.B. Nicotine induced inhibition of the activities of accessory reproductive ducts in male rats. *J. Ethnopharmacol.*, v.60, n.3, p.215-221, 1998.

MADDEN, J.S. The definition of alcoholism. *Alcohol Alcohol.*, v.28, n.6, p.617-620, 1992.

MANNINO, D.M.; KLEVENS, R.M.; FLANDERS, W.D. Cigarette smoking: An independent risk factor for importance? *Am. J. Epidemiol.*, v.140, n.11, p.1003-1008, 1994.

MARANO, G.; RAMIREZ, A.; MORI, I.; FERRARI, A.U. Sympathectomy inhibits the vasoactive effects of nicotine in conscious rats. *Cardiovasc. Res.*, v.42, n.1, p.201-205, 1999.

MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G. Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.84, n.10, p. 3463-3468, 1999.

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. *Develop. Biol.*, v.253, p.165-174, 2003.

MARKOPOULOS, A.K.; POULOPOULOS, A.K.; KAYAVIS, I.; PAPANAYOTOU, P. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Dis.*, v.6, n.1, p.31-34, 2000.

MARKS, V.; WRIGHT J. Metabolic effects of alcohol. *Clin. Endocrinol. Metab.*, v.7, p.245-466, 1978.

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. 1-8, 1993.

MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J.; PADOVANI, C.R.; CAGNON, V.H.A.; MARTINEZ M. A. morphometric ultrastructural study of the seminal vesicle of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.29, n.4, p.537-542, 1997.

McNEAL, J.E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest. Urol.*, v.15, p.340-345, 1978.

MEADE, T.W.; IMESON, J.; STIRLING, Y. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet*, v.31, n.2, p.986-988, 1987.

MEIKLE, A.W.; LIU, X.H.; TAYLOR, G.N.; STRINGHAM, J.D. Nicotine and cotinine effects on 3 alpha hydroxysteroid dehydrogenase in canine prostate. *Life Sci.*, v.43, p.1845-1850, 1988.

MELLO, N.K. Effect of alcohol and marihuana on tobacco smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.27, p.202-209, 1980.

MJOS, O.D. Lipid effects of smoking. *Am. Heart J.*, v.115, p.272-275, 1988.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. 3. ed. New York: John. Wiley, p. 649, 1991.

NOBLE, E. P.; SYNDULKO, K.; FITCH, R.J.; RITCHIE, T.; SPARKES, R.S. D2 dopamina receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? *Med. Hypotheses*, v.42, n.4, p.257-260, 1994.

PRINS, G.S.; BIRSCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*, v.129, p.3187-3199, 1991.

PRINS, G.S.; BIRCH, L.; COUSE, J.F.; CHOI, I.; KATZENELLENBOGEN, B.; KORACH, K.S. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res.*, v.61, p.6089-6097, 2001.

REED, T. et al. Correlation of alcohol consumption with related covariates and heritability estimates in older adult males over 14 to 18 year period: the NHLBI Twin Study. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v.18, p.702-710, 1994.

REDDY, S.; LONDONKAR, R.; PATIL, S.B. Testicular changes due to graded doses of nicotine in albino mice. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, v.42, n.2, p.276-280, 1998.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v.17, p.208, 1963.

RIESENFELD, A.; OLIVA, H. Effects of nicotine on the fertility, cytology and life span of male rats. *Acta Anat. (Basel)*, v.131, n.2, p.171-176, 1988.

RISBRIDGER, G.; WANG, H.; YOUNG, P.; KURITA, T.; WANG, Y.Z.; LUBAHN, D.; GUSTAFSSON, J.A.; CUNHA, G.R.; WONG, Y.Z. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev. Biol.*, v.231, n.1, p.289, 2001.

RISBRIDGER, G.P.; BIANCO, J.J.; ELLEM, S.J.; MCPHERSON, S.J. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, v.10, n.2, p.187-191, 2003.

ROSEMBERG, J. *Tabagismo, sério problema de saúde pública*. 1ª ed., São Paulo: Almed, p.370, 1981.

SALONEN, I.; HUHTANIEMI, I. Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat. *Biol Reprod.*, v.42, p.55-62, 1990.

SATTOLO, S.; CARVALHO, C.A.F.; CAGNON VH. Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue Cell*, v.36, n.6, p.417-430, 2004.

SAXENA, S.; MEEHAN, D.; CONEY, P.; Wimalasena, J. Ethanol has direct inhibitory effects on steroidogenesis in human granulosa cells: specific inhibition of LH action. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.14, p.522-527, 1990.

SETCHELL, B.P.; BROOKS, P.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, p.753-836. 1988.

SPRANDO, R.L. Perfusion of rat testis through the heart using heparin. In: RUSSEL, L.D.; ETTILIN, A. P.S.; CLEEG, E.D. *Histological and Histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, p.277-280, 1990.

SRIKANTH, V.; MALINI, T.; ARUNAKARAN, J.; GOVINDARAJULU, P.; BALASUBRAMANIAN, K. Effects of ethanol treatment on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.288, p.509-515, 1999.

STERLING, T.D.; KOBAYASHI, D. A critical review of reports on the effect of smoking on sex and fertility. *J. Sex. Res.*, v.11, p.201-217, 1975.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol Reprod.*, v.34, p.973-983, 1986.

TADIC, S.D.; ELM; M.S.; SUBBOTIN, V.M.; EAGON, P.K. Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. *Hepatology*, v.31, p.1135-1140, 2000.

TENTLER, J.J.; LaPAGLIA, N.; STEINER, J.; WILLIAMS, D.; CASTELLI, M.; KELLEY, M.R.; EMANUELE, N.V.; EMANUELE, M.A. Ethanol, growth hormone and testosterone in prepubertal rats. *J. Endocrinol.*, v.152, p.477-487, 1997.

TONEATTO, A.; SOBELL, L.C.; SOBELL, M.B.; KOZLOWSKI, L.T. Effect of cigarette smoking on alcohol treatment outcome. *J. Subst. Abuse*, v.7, p.245-452, 1995.

TOORIAN, A.W.; KELLEHER, S.; GOOREN, L.J.; JIMENEZ, M.; HANDELSMAN, D.J. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, v.88, n.11, p.5207-5211, 2003.

TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; SMITH, M.J.; SMITH, V.C.; DANG, T.D.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin. Cancer Res.*, v.8, p.2912-2923, 2002.

UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol.*, v.40, p.121-128, 2005.

VAN DER GULDEN, J.W.J.; VERBEEK, A.L.M.; KOLK, J.J. Smoking and drinking habits in relation to prostate cancer. *Br. J. Urol.*, v.73, p.382-389, 1994.

VAN THIEL, D.H.; LESTER, R.; SHERINS, R.J. Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. *Gastroenterology*, v.67, p.1188-1199, 1974.

VAN THIEL, D. H. & LESTER R. The effect of chronic alcohol abuse on sexual function. *Clin. Endocrinol Metab.*, v.8, n.3, p.499-510, 1979.

VILAMAIOR, P.S.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *The Prostate*, v.45, n.3, p.253-258, 2000.

VOGT, H.J.; HELLER, W.D.; OBE, G. Spermatogenesis in smokers and non-smokers. An andrological and genetic study. In: Obe, Mutations in man; *Springer, Berlin*, p.247-291, 1984.

XIE, W.; WONG, I.C.; TSAO, S.W. Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *The Prostate*, v.44, n.1, p.31-39, 2000.

WANG, Y.J.; WU, J.C.; LEE, S.D.; TSAY, Y.T.; LO, K.J. Gonadal dysfunction and changes in sex hormones in postnecrotic cirrotic men: a matched study with alcoholic cirrotic men. *Hepato-Gastroenterol.*, v.38, p.531-534, 1999.

WATSON, M.L. Staining of tissues sections for electron-microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v.4, p.475, 1958.

WEIHUA, Z.; MAKELA, S.; ANDERSSON, L.C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J.I.; JENSEN, E.V.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci (U S A)*., v.98, n.11, p.6330-6335, 2001.

WEIHUA, Z.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell Endocrinol.*, v.193, n.1-2, p.1-5, 2002.

WEISBERG, E. Smoking and reproductive health. *Clin. Reprod. Fertil.*, v.3, n.3, p.175-186, 1985.

WONG, Y.C.; XIE, W.; TSAO, S.W. Structural changes and alteration in expression of TGF-beta1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. *The Prostate*, v.45, p.289-298, 2000.

WRIGHT, A.S.; THOMAS, L.N.; DOUGLAS, R.C.; LAZIER, C.B.; RITTMASER, R.S. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J. Clin. Invest.*, v.98, n.11, p.2558-2563, 1996.

YAMASHITA, A.; HAYASHY, N.; SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R.; KAWAMURA, J. Influence of diethylstilbestrol, Leuprolelin (a luteinizing hormone-releasing hormone analog), Finasteride (a 5 alpha-reductase inhibitor), and castration on the lobar subdivisions of the rat prostate. *The Prostate*, v.29, n.1, p.1-14, 1996.

ZHU, B.Q. & PARMLEY, W.W. Hemodynamic and vascular effects of active and passive smoking. *Am. Heart J.*, v.130, n.6, p.1270-1275, 1995.