



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Beatriz Aparecida Fioruci

“Retinol, ácido retinóico e seus receptores e o índice de proliferação celular e de apoptose no lobo dorsolateral da próstata de ratos adultos UCh (bebedores voluntários de etanol a 10%)”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Beatriz Aparecida Fioruci</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F513r	<p>Fioruci, Beatriz Aparecida Retinol, ácido retinóico e seus receptores e o índice de proliferação celular e de apoptose no lobo dorsolateral da próstata de ratos adultos UCh (bebedores voluntários de etanol a 10%) / Beatriz Aparecida Fioruci. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Francisco Eduardo Martinez. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Próstata. 2. Etanol. 3. All-trans-retinol. 4. All-trans-ácido-retinóico. 5. Receptores do ácido retinóico. I. Martinez, Francisco Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/lb)</p>
--------------	---

Título em inglês: Retinol, retinoic acid and its receptors and the rate of cell proliferation/apoptosis in the dorsolateral prostate lobe of adult UCh rats (10% (v/v) ethanol voluntary drinkers).

Palavras-chave em inglês: Prostate; Ethanol; All-trans-retinol; All-trans-retinoic-acid; Retinoic acid receptors.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Francisco Eduardo Martinez, Raquel Fantin Domeniconi, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.

Data da defesa: 25/03/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 25 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez (Orientador)



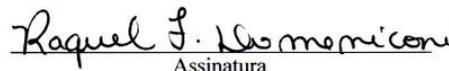
Assinatura

Profa. Dra . Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



Assinatura

Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi



Assinatura

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Assinatura

Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Assinatura

"Ama-se mais o que se conquista com esforço".

Benjamin Disraeli

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso".

John Ruskin

Dedicatória

Ao meu pai:

José Fioruci, verdadeiramente um grande mestre;

À minha mãe:

Marlene Fioruci, exemplo de mãe e caridade;

Às minhas irmãs:

Bianca Fioruci e Bruna Fioruci, minhas melhores amigas;

Ao meu noivo:

Francisco Fontanelli Neto, meu grande amor.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez, por sua amizade, por ter acreditado neste projeto e por TODAS as discussões e correções no sentido de melhorar este trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, por toda ajuda dispensada para a realização deste trabalho, principalmente pela ajuda na padronização dos protocolos de imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. Sérgio Pereira, pela disposição em ajudar na padronização de protocolos de imuno-histoquímica, mesmo durante seu Pós-doutorado na Espanha.

Aos Profs. Drs. Humberto Santo Neto, Alexandre L. R. de Oliveira e Wagner José Fávares, por aceitarem participar da banca de minha qualificação e pelas considerações que fizeram contribuindo assim para minha formação.

Aos Profs. Drs. Raquel Fantin Domeniconi, Wagner José Fávares e Valéria Helena Cagnon, pelos esclarecimentos e pelas correções feitas, contribuindo para a melhoria deste trabalho.

Aos amigos da Pós-graduação, Leonardo, Giovana, Gustavo e João, por todo conhecimento compartilhado, pelas discussões e claro, pelos bons momentos de risadas.

Ao Prof. Dr. Otávio Augusto Martins, orientador da minha monografia e colega de Pós-graduação, por me incentivar a iniciar o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior, por ter possibilitando a realização do estágio no laboratório do Dep. de Anatomia, o qual acrescentou muito em minha formação acadêmica e me despertou para a realização da Pós-graduação.

À todos os docentes do Departamento de Anatomia Humana, pela amizade e agradável convivência.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia (Cris, Paulo, Luciano, Marcos e Giva), pela amizade e presteza dos serviços, em especial, ao amigo Gelson Rodrigues, pela divertida companhia.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp e seus docentes, pela qualidade do programa e pelo excelente nível de profissionais.

À secretária do Programa de PG Biologia Celular e Estrutural, Líliam Alves Senne Panágio, pela atenção com que trata os alunos e pela ajuda, principalmente durante a fase final deste trabalho, sempre me lembrando dos prazos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Antonio Rugolo Júnior, do Dep. de Pediatria (FMB/Unesp), por possibilitar a utilização do aparelho de HPLC do Laboratório experimental da Pediatria.

À Dra. Cilmary Suemi Kurokawa, pesquisadora responsável do Laboratório experimental da Pediatria, por sua amizade, por brilhante competência e pelos ensinamentos relacionados ao HPLC, sem o qual teria sido difícil realizar este trabalho.

Aos funcionários do Laboratório experimental da Pediatria que sempre me receberam com muito carinho e estavam sempre dispostos a ajudar.

Às minhas amigas, Paula, Dorcas, Gra, Fer, Natália e Pri, por torcerem por mim, pela amizade e pelas reuniões sempre muito divertidas e engraçadas, que ajudavam a espairecer.

A toda minha família (Avós, Tios e primos), por toda palavra de incentivo, pelo carinho e por fazerem parte da minha história.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram durante este percurso, muito obrigada.

Sumário

Resumo	10
Abstract	12
Introdução Geral.....	14
Alcoolismo e Sistema genital masculino.....	14
Modelo experimental.....	16
Próstata, retinol e ácido retinóico.....	16
Etanol, retinol e ácido retinóico.....	20
Justificativa.....	22
Objetivos.....	22
Artigo.....	24
Conclusão Final.....	60
Referências da Introdução Geral.....	61

Resumo

A exposição ao etanol altera a concentração do retinol e do *all-trans*-ácido retinóico (*atAR*) em vários tecidos. Os retinóides, retinol e *atAR*, são importantes para a diferenciação e manutenção das células epiteliais da próstata. O *atAR* se liga aos receptores de ácido retinóico ($RAR\alpha$, β e γ) e a interação receptor/ligante com a sequência responsiva ao retinóide no DNA, levam à transcrição de genes alvos. Assim, o *atAR* exerce efeitos no crescimento celular, diferenciação e apoptose, sendo essencial no desenvolvimento e diferenciação de órgãos e tecidos. Nosso objetivo foi analisar o retinol, o ácido retinóico e seus receptores, bem como, o índice de proliferação celular e de apoptose no lobo dorsolateral da próstata de ratos adultos UCh. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10/grupo): UChA (ingestão voluntária de etanol a 10% (v/v)); UChACo (controle – ausência de etanol); UChB (ingestão voluntária de etanol a 10% (v/v) e UChBCo (controle – ausência de etanol). Após 150 dias de experimentação, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue do tronco e os lobos dorsolaterais das próstatas foram coletados e processados: (1) para análises da concentração do retinol e do *atAR* no plasma e na próstata por meio de HPLC; (2) e análises de microscopia de luz para a proliferação celular (Ki-67), apoptose (Tunel) e para os receptores de ácido retinóico, por meio dos anticorpos anti- $RAR\alpha$, $-\beta$ e $-\gamma$. O consumo crônico de etanol diminuiu a concentração do retinol no plasma dos grupos UChB (consumo alto de etanol) e UChA (consumo baixo de etanol). A concentração do retinol foi ainda menor no plasma do grupo UChB comparado ao UChA. No entanto, a concentração do retinol no tecido prostático não teve diferença significativa entre os grupos. O *atAR* aumentou significativamente somente no plasma do grupo UChB. Na próstata, a concentração do *atAR* aumentou no grupo

UChB, enquanto que no UChA não houve diferença estatística. O RAR α na próstata dorsal e lateral dos ratos UCh não foi alterada em função do consumo de etanol. Já os RAR β e γ apresentaram aumento do sinal na próstata dorsal do grupo UChB. Não houve diferença no índice de proliferação celular e de apoptose nas próstatas dorsais e laterais dos grupos experimentais. Conclui-se que o etanol altera a concentração do retinol e do *atAR* no plasma. Essa alteração é diretamente proporcional à quantidade de etanol consumida. Já na próstata, o retinol não é alterado pelo etanol. O consumo alto de etanol altera a concentração do *atAR* na próstata dorsolateral e a expressão dos RAR β e γ na próstata dorsal. A alteração da expressão dos RAR pode aumentar a sensibilidade da próstata à ação do *atAR*. O etanol não altera a proliferação celular e a apoptose na próstata dorsal e lateral.

Palavras chave: retinol, ácido retinóico, receptor de ácido retinóico, próstata, etanol.

Abstract

Ethanol exposure alters the concentration of retinol and all-trans retinoic acid (atAR) in several tissues. Retinoids (retinol and atAR) are essential for the differentiation and homeostasis of the prostate epithelial cells. atAR binds to retinoic acid receptors (RAR α , β and γ) and the interaction receptor/ligand with the sequence responsive to retinoid into DNA lead to transactivation of target genes. Thus, atAR directly produces their effects on cell growth, differentiation and apoptosis. This study aimed to analyze the retinol and all-trans-retinoic acid concentrations and its atAR receptors as well as the cell proliferation and apoptosis index upon the dorsolateral prostate lobe of adult UCh rats. All animals were divided into four experimental groups (n = 10/group): UChA (10% ethanol (v / v) voluntary intake); UChACo (without ethanol consumption); UChB (10% ethanol (v / v) voluntary intake) and UChBCo (without ethanol consumption). After 150 days of experimentation, animals were sacrificed followed by decapitation and trunk blood and dorsolateral prostate lobes collected. Samples of plasma and prostate by concentration analysis of the retinol and atAR were processed for HPLC. The cell proliferation and apoptosis immunoreactivities were assessed by Ki-67 and TUNEL, respectively, and nuclear receptors by anti-RAR α , β and γ . Chronic ethanol consumption reduced the concentration of plasma retinol in UChB (high ethanol intake) and UChA groups (low ethanol intake). The retinol concentration in plasma was even lower in UChB compared to UChA group. However, the retinol concentration in prostate tissue was not significantly different between the groups. Concentration of atAR increased in plasma of UChB group, and was 96% higher in the UChA group. The prostate, atAR increased in the UChB group, while in UChA group no statistical difference. There was no statistical difference in proliferation cell and apoptosis

in the dorsal and lateral prostate lobes between the groups. The expression of RAR α in the dorsal and lateral prostate of UCh rats was not altered as a function of ethanol consumption. Already RAR β and γ showed increased signal in the dorsal prostate UChB group. We conclude that ethanol alters the concentration of retinol and atAR in plasma. This change is directly proportional to the amount of ethanol consumed. In the prostate, retinol is not altered by ethanol. The high ethanol intake alters the concentration of atAR in dorsolateral prostate and the expression of RAR β and RAR γ in the dorsal prostate. Alteration in expression of RAR can increase sensitivity to the action of the atAR in prostate. Ethanol does not alter cell proliferation and apoptosis in the dorsolateral prostate.

Key words: retinol, retinoic acid, retinoic acid receptors, prostate, ethanol.

Introdução Geral

Alcoolismo e Sistema genital masculino

O alcoolismo é um dos tipos mais prevalentes de dependência de droga no mundo (Rehm *et al.*, 2006). A ingestão de álcool, por período de tempo prolongado, causa danos no organismo que vão desde problemas hepáticos até o desenvolvimento de cânceres. Cerca de 3,6% de todos os cânceres ocorrem em função do consumo crônico de etanol (Rehm *et al.*, 2004). Alguns fatores como, genéticos e a quantidade de etanol ingerida podem modular e determinar os danos nos órgãos ou a carcinogênese.

Alguns mecanismos moleculares são propostos para a contribuição do etanol na carcinogênese como, o aumento da geração de radicais livres e acetaldeído (AA) que tem efeito mutagênico e carcinogênico; a indução do citocromo microssomal P4502E1 (CYP); ativação de enzimas que atuam em diferentes pró-carcinogênicos e geram radicais livres que podem danificar diretamente o DNA e; a interferência no metabolismo do retinol (vitamina A) e do ácido retinóico (Pöschl & Seitz, 2004; Wang, 2005; Seitz & Stickel, 2007).

O consumo excessivo de etanol compromete imediatamente o sistema nervoso central, mas ao longo prazo, também prejudica outros sistemas como o digestório, urinário e genital masculino e feminino (Marks & Wright, 1978; Martinez *et al.*, 2001 a,b; Edenberg *et al.*, 2005; Chuffa *et al.*, 2009). No fígado, o consumo de álcool provoca redução da oxidação dos ácidos graxos, da glicogênese e da albumina (Thompson, 1978). O aumento de acetato, gerado pela oxidação do etanol, modifica o metabolismo dos ácidos graxos pela inibição da lipólise, causando esteatose hepática (Hirata & Hirata, 1991; Lieber & De Carli, 1991).

Nos órgãos do sistema reprodutor masculino, a ingestão crônica de etanol provoca alterações morfológicas e fisiológicas (Galvão-Teles *et al.*, 1973; Van Thiel *et al.*, 1979; Martinez *et al.*, 2000; Montico *et al.*, 2010). No testículo, o etanol age tanto como toxina direta, alterando a produção de testosterona, como indireta, interferindo no eixo-hipotálamo-hipófisário-gonadal (Van Thiel, 1983; Saxena *et al.*, 1990; Tadic *et al.*, 2000). Além disso, as células germinativas também são afetadas, desencadeando aumento do processo apoptótico, causando danos à espermatogênese e à infertilidade (Zhu *et al.*, 2000).

Estudos sobre os efeitos do consumo crônico de etanol na morfofisiologia da próstata de ratos relataram atrofia do epitélio (Martinez *et al.*, 2001), interrupção da homeostase estroma-epitélio, presença de neoplasia intra-epitelial prostática, seguido de hipertrofia e presença de células inflamatórias (Cândido *et al.*, 2007). Em camundongos, o consumo de etanol também resultou em atrofia do epitélio da próstata ventral, além de levar a desorganização do complexo de Golgi e presença de estruturas ligadas à membrana celular, provavelmente material citoplasmático e acúmulo de corpos densos (Cagnon *et al.*, 2001). A análise ultra-estrutural dos lobos dorsais e laterais da próstata de ratos Wistar submetidos à ingestão crônica de aguardente de cana de açúcar resultou em atrofia progressiva do epitélio glandular, redução das cisternas do retículo endoplasmático e ruptura dos microvilos (Cagnon *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1999).

Embora sejam claros os efeitos nocivos do consumo de etanol na próstata, as consequências de sua toxicidade são complexas, sendo que dúvidas persistem quanto à morfofisiologia do estroma e sua interação com as células epiteliais em resposta ao alcoolismo crônico (Cândido *et al.*, 2007).

O modelo experimental

Para estudar os danos causados pelo etanol no organismo, pesquisadores têm investigado roedores com preferências ao consumo de etanol (Spanagel, 2000). Li *et al.* (1987) relataram a existência de três pares de variedades de roedores que consomem etanol, contudo, os únicos considerados como linhagens puras, por se manterem permanentemente sob cruzamentos *inbreeding*, são as UChA e B.

As variedades de ratos UCh (UCh = Universidade do Chile), UChA (consumo baixo de etanol) e UChB (consumo alto de etanol) possuem predisposição genética para ingerir voluntariamente etanol a 10% e foram selecionadas, a partir de ratos Wistar, por cerca de 70 gerações (Mardones, 1993; Quintanilla *et al.*, 2007). Assim, os modelos UCh são considerados adequados para explicar aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos relacionados ao consumo abusivo de bebidas alcoólicas por humanos (Martinez *et al.*, 2000; Cândido *et al.*, 2007).

Próstata, retinol e ácido retinóico

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina localizada na base da bexiga urinária, ao redor da uretra. No homem, a próstata é compacta (alobular) apresentando três zonas: central, periférica e de transição. No rato, é multilobulada, dividida em quatro pares de lóbulos: anterior, dorsal, ventral e lateral (Roy-Burman *et al.*, 2004). Nos últimos anos, o interesse dos pesquisadores pela próstata tem aumentado por ser um órgão frequentemente afetado por diferentes patologias como a inflamação, a hiperplasia prostática benigna e o câncer (Guess, 2001; Mao *et al.*, 2004). Os carcinomas acometem frequentemente a zona

periférica da próstata, local considerado análogo ao lobo dorsolateral da próstata de roedores (Burman-Roy *et al.*, 2004; Vykhovanets *et al.*, 2007).

A próstata é composta de células epiteliais e estroma. O epitélio da próstata é constituído de três tipos celulares: basal, secretor (luminal) e neuroendócrino (NE). As células do epitélio prostático possuem propriedades de reserva (*stem cell*), de secreção de proteínas, neuropeptídios e substâncias que conferem ao final da secreção da próstata um líquido de aspecto leitoso, essencial para a mobilidade e fertilidade dos espermatozóides e de fundamental importância no processo reprodutivo (Aumüller, 1989; Vittoria *et al.*, 1990; Hazem *et al.*, 2002). O estroma prostático é formado por um complexo arranjo de células e componentes da matriz extracelular (MEC) associados a fatores de crescimento, moléculas regulatórias e enzimas remodeladoras (Narbaitz, 1975; Labat-Robert *et al.*, 1990).

O retinol (vitamina A) é obtido pelos animais através da dieta. Sua obtenção pode ocorrer por meio de duas formas precursoras, a forma de pró-vitamina A (carotenóides) ou a vitamina A pré-formada (estearato ou palmitato), que posteriormente são convertidas para retinol. Além disso, diversos alimentos industrializados são enriquecidos com vitamina A (Olson, 2001).

O retinol pode ter vários destinos no organismo, podendo ser transportado para diversos tecidos, ser levado ao fígado para ser armazenado ou sofrer processo de oxidação gerando metabólitos polares (MacDonald & Ong, 1988; Napoli, 1996). Para que o retinol seja transportado para outros tecidos ele precisa ligar-se a proteína ligante de retinol plasmática (*retinol binding proteins – RBP*), a qual o leva até órgãos alvo para sua ação, reconhecendo células específicas com receptor de superfície para RBP, STRA6 (Napoli, 1996; Kane *et al.*, 2009).

No ambiente intracelular, o retinol pode ser oxidado a ácido retinóico ou estocado sob a forma de ésteres de retinol em gotas de gordura (Miano & Berch, 2000). Para que o retinol seja oxidado, ele é vinculado à proteína citoplasmática ligante de retinol (CRBP) que o entrega à enzimas específicas (Napoli, 1996). A oxidação do retinol gera ácido retinóico e ocorre por um processo de duas etapas. O retinol é primeiro oxidado à retinal, através das enzimas álcool/retinol desidrogenases (ADH/Rdh) e, em seguida, o retinal é oxidado a ácido retinóico, por enzimas aldeído/retinaldeído desidrogenases (ALDH/Raldh) (Duester, 2001). A oxidação do retinol gera primeiramente dois metabólitos, o *all-trans*-ácido retinóico (*atAR*) e o *9-cis*-ácido retinóico, contudo o *atAR* é descrito como o principal metabólito e o mais abundante.

O *atAR* pode modular a expressão gênica e controlar vias biológicas como proliferação e crescimento celular, diferenciação epitelial e apoptose (Aboseif *et al.*, 1997). A modulação da expressão gênica pelo *atAR* pode ocorrer através dos receptores de ácido retinóico (RARs), mecanismo “clássico” de ação do *atAR*, ou pela indução de fatores citoplasmáticos, mecanismo denominado de “não-clássico” (Aggarwal *et al.*, 2006; Fields, *et al.*, 2007). Existem três subtipos de RAR (α , β e γ), que são codificados por três diferentes genes, aos quais o *atAR* pode ligar-se (Fields *et al.*, 2007). A ligação do *atAR* com os RARs faz com que o receptor se ligue a regiões do DNA responsivas ao ácido retinóico denominadas RARE (*retinoic acid response elements*), e module a expressão gênica (Zou *et al.*, 2007; Fields *et al.*, 2007).

O retinol e o ácido retinóico, conhecidos coletivamente como “retinóides”, são importantes para os órgãos do sistema reprodutor, por isso, atualmente são descritos como esteróides, junto com andrógenos e estrógenos (Prins *et al.*, 2006; Fields *et al.*, 2007; Prins

& Putz, 2008). Tem sido descrito que a manutenção da homeostase do epitélio dos ductos genitais, da vesícula seminal e do testículo e ainda a espermatogênese, dependem dos retinóides (Huang *et al.*, 1983; Ghyselinck *et al.*, 1999). Adicionalmente, o ácido retinóico tem importante papel na diferenciação das células do epitélio da próstata (Lasnitzki & Goodman, 1974) e no desenvolvimento e manutenção da homeostase da glândula no adulto (Prins & Putz, 2008; Vezina *et al.*, 2008). A deficiência de retinol causa danos aos órgãos reprodutores dos machos, resultando em anormalidades da espermatogênese, reduzidos níveis de testosterona e regressão prostática associada com queratinização do epitélio e metaplasia escamosa (Reichman *et al.*, 1990; Richter *et al.*, 2002).

A diminuição da concentração do retinol no plasma durante o câncer de próstata (CaP), sugere que há uma tendência significativa de risco de CaP com a diminuição dos níveis séricos de retinol (Reichman *et al.*, 1990; Mao *et al.*, 2004). A expressão dos RAR na próstata parece ser influenciada pela quantidade de retinóides (Pasquali *et al.*, 1996; Pasquali *et al.*, 1999). Concentrações baixas do ácido retinóico foram relatados no CaP (Pasquali *et al.*, 1996), além disso, ausência de expressão do RAR β foram descritos (Lotan *et al.*, 2000).

Há também evidências de que a atividade do RAR possa estar ligada a patologias da próstata, uma vez que os RAR α , β e γ apresentam alterações na distribuição celular durante a doença prostática benigna e o câncer de próstata em humanos e em modelos de ratos com câncer de próstata (Richter *et al.*, 1999; Richter *et al.*, 2002).

Etanol, retinol e ácido retinóico

O etanol, depois de ser absorvido pelo trato gastro-intestinal, é transportado através da circulação portal ao fígado onde é oxidado. No hepatócito, há três vias metabólicas com a capacidade de oxidar o etanol: o sistema da enzima álcool desidrogenase (ADH) na matriz citoplasmática; o sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS) no retículo endoplasmático liso e o da catalase nos peroxissomos. A via metabólica da enzima álcool desidrogenase (ADH) é a responsável pela maior parte do processo de oxidação do etanol (Lieber & De Carli, 1991; Lieber, 1993).

As enzimas que metabolizam o etanol à acetaldeído e o acetaldeído à ácido acético, são membros da família das enzimas álcool (ADH) e aldeído desidrogenases (ALDH) que oxidam o retinol à retinal e o retinal à ácido retinóico, respectivamente (Duester, 2000; Wang, 2005). Em função dessa interação metabólica, tem sido proposto que a presença do etanol diminui a velocidade da reação para formação de retinal a partir de retinol, limitando a síntese de ácido retinóico, através da inibição competitiva da oxidação do retinol (Duester, 1999). Contudo, o consumo crônico de etanol pode interferir no metabolismo e na concentração do retinol e do ácido retinóico nos tecidos por outros mecanismos como, pela alteração de enzimas que participam na absorção do retinol nas células, pelo aumento da degradação do retinol no fígado, pelo aumento da mobilização do retinol do fígado para outros órgãos e pela inibição ou ativação das enzimas envolvidas na oxidação e no catabolismo do ácido retinóico (Leo & Lieber, 1999; Seitz, 2000; Liu *et al.*, 2001; Kane *et al.*, 2009). Adicionalmente, as alterações na concentração do retinol e do ácido retinóico pelo etanol podem depender do tecido analisado, da quantidade de etanol e do tempo de exposição (Kane *et al.*, 2009).

A exposição ao etanol diminui a concentração do ácido retinóico no fígado de ratos. Esse evento correlaciona-se ao aumento da proliferação dos hepatócitos e predispõem instabilidade genômica e desenvolvimento da carcinogênese (Wang *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001).

Foram observados problemas na espermatogênese de ratos expostos ao etanol em função da diminuição da vitamina A (retinol) (Van Thiel *et al.*, 1974). Concentrações aumentadas do *atAR* foram observadas no hipocampo, testículo e soro após exposição crônica ao etanol (Kane *et al.*, 2009). O etanol também aumentou a capacidade dos astrócitos de sintetizarem *atAR in vitro* e os níveis do *atAR* no cerebelo, *in vivo* (McCaffery *et al.*, 2004).

Os órgãos requerem o ácido retinóico para se desenvolverem, por isso, algumas regiões são sensíveis ao seu excesso, que atua como teratógeno (McCaffery *et al.*, 2003). O consumo de etanol durante a gestação pode levar ao aparecimento da Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), caracterizada por anormalidades faciais, crescimento retardado, dificuldades intelectuais e problemas comportamentais (Krulwich, 2005). Tem sido descrito semelhanças entre as anormalidades observadas na SAF com as anormalidades resultantes da teratogenicidade do ácido retinóico provocada por sua alta concentração (Duester, 1992; Zachman & Grummer, 1998). No entanto, alguns pesquisadores têm mostrado que o etanol diminui os níveis de ácido retinóico durante o desenvolvimento e que este evento pode ser fator importante para a SAF (Grummer *et al.*, 1993; Deltour *et al.*, 1996).

A perda da homeostase do ácido retinóico pode contribuir para alterações induzidas pelo etanol no desenvolvimento, na função cognitiva e no aumento do risco de câncer (Bagnardi *et al.*, 2001; Warren & Foudin, 2001). Além disso, a homeostase do *atAR* é

importante já que suas funções podem ser reguladas de forma dependente de sua concentração (De Luca, 1991).

Justificativa

Na literatura científica especializada há interesse em pesquisas que avaliem os efeitos do consumo crônico de etanol sobre a concentração do retinol e do ácido retinóico nos tecidos. O etanol interfere no metabolismo do retinol e do *atAR*, podendo alterar suas concentrações, dependendo do tecido analisado, da quantidade de etanol e do tempo de exposição (Kane *et al.*, 2009). O *atAR* modula a expressão gênica e controla vias biológicas como a proliferação e a apoptose (Aboseif *et al.*, 1997). Tais eventos podem ser regulados dependendo da concentração do *atAR* (De Luca, 1991). O retinol e o ácido retinóico são importantes para a homeostase da próstata de ratos adultos. Portanto, estudos sobre os efeitos do etanol na concentração dos retinóides na próstata poderiam contribuir para discussão e formação das teorias envolvidas sobre os efeitos do etanol no metabolismo do retinol e do *atAR* e trazer novas perspectivas a respeito dos prejuízos causados pelo consumo de etanol na próstata, sendo pertinentes.

Objetivos

- Avaliar a concentração do retinol e do *atAR* no plasma e no lobo dorsolateral da próstata de ratos adultos UCh (bebedores voluntários crônicos de etanol a 10%);
- Avaliar os receptores nucleares RAR α , β e γ no epitélio da próstata;

- Avaliar se há correlação da concentração do *atAR* com os índices de proliferação celular e de apoptose.

Artigo

O presente trabalho originou um artigo que foi submetido ao periódico “*The Journal of Nutrition*”, o qual se intitula “O etanol altera a concentração do *all-trans*-ácido retinóico e os receptores de ácido retinóico (RAR) na próstata de ratos adultos”, e que será apresentado a seguir.

Artigo**O etanol altera a concentração do *all-trans*-ácido retinóico e os receptores de ácido retinóico (RAR) na próstata de ratos adultos**

Beatriz Aparecida Fioruci^{1,2}, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa^{1,2}, Giovana Rampazzo Teixeira¹, João Paulo de Arruda Amorim^{1,2}, Leonardo de Oliveira Mendes^{1,2}, Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro¹, Otávio Augusto Martins¹, Cilmery Suemi Kurokawa³, Sergio Pereira¹, Wílson de Mello Júnior¹, Marcelo Martinez⁴, Antonio Rugolo Júnior³, Francisco Eduardo Martinez^{1*}.

¹ Department of Anatomy - IBB/UNESP – Univ Estadual Paulista, SP

² Program of post-graduation in Cell Biology and Structural, UNICAMP/Campinas, SP

³ Department of Pediatrics – FMB/UNESP – Univ Estadual Paulista, SP

⁴ Department of Morphology and Pathology – UFSCar – Federal University of São Carlos, São Carlos, SP.

Running title: Retinol, ácido retinóico e receptores e o índice de proliferação celular e de apoptose na próstata de ratos UCh

Agência Financiadora: CAPES.

***Corresponding author:**

Francisco Eduardo Martinez, Department of Anatomy, Institute of Bioscience, UNESP – Univ Estadual Paulista, P.O. Box 510, Postal Code: 18618-000, Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP – Brazil, Telephone number: +55 (14) 3811-6040, Fax: +55 (14) 3811-6361, martinez@ibb.unesp.br

Resumo

O etanol altera a concentração do retinol e do *all-trans*-ácido retinóico (*atAR*) em alguns tecidos. O retinol e o *atAR* são importantes para a proliferação celular, diferenciação e manutenção da homeostase da próstata. Alterações na concentração do retinol, do ácido retinóico e na expressão dos RAR durante patologias da próstata, sugerem que essa via tem efeitos sobre doenças prostáticas (Richter et al., 2002; Pasquali et al., 1996; 1999). Nosso objetivo foi analisar se o etanol altera o retinol, o ácido retinóico e seus receptores e o índice de proliferação celular e de apoptose no lobo dorsolateral da próstata de ratos adultos. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10/grupo): UChA (ingestão voluntária de etanol a 10% (v/v), UChACo (controle – ausência da ingestão de etanol), UChB (ingestão voluntária de etanol a 10% (v/v) e UChBCo (controle – ausência da ingestão de etanol). Após 150 dias de experimentação, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue do tronco e os lobos dorsolaterais das próstatas foram coletados e processados para analisar a concentração do retinol e do *atAR* no plasma e na próstata por HPLC e a proliferação celular (Ki-67), apoptose (Tunel) e os receptores do ácido retinóico (anti-RAR α , - β e - γ) por meio de microscopia de luz. O etanol diminuiu a concentração do retinol no plasma dos grupos UChB e UChA, sendo menor no UChB. A concentração do retinol no tecido prostático não teve diferença significativa. O *atAR* aumentou no plasma e na próstata do grupo UChB. O RAR α distribuiu-se pelo epitélio da próstata dorsolateral dos ratos UCh não alterando o sinal positivo entre os grupos. O RAR β aumentou a expressão na próstata dorsal do UChB. O RAR γ foi observado apenas na próstata dorsal, sendo maior no UChB. Não houve diferença significativa no índice da proliferação celular e apoptose na próstata dorsolateral. Conclui-se que o etanol altera a concentração do retinol e do *atAR* no

plasma de forma diretamente proporcional à quantidade de etanol consumida. Enquanto que na próstata, a concentração do retinol não é alterada pelo etanol. O consumo alto de etanol aumenta a concentração do *atAR* na próstata dorsolateral e a expressão dos $RAR\beta$ e γ na próstata dorsal. Os índices de proliferação celular e apoptose da próstata não se alteram com o consumo de etanol e não apresentam correlação com a concentração do *atAR*.

Palavras chave: retinol, ácido retinóico, receptor de ácido retinóico, próstata, etanol.

Introdução

O alcoolismo é um dos tipos mais frequentes de dependência de droga no mundo (Rehm *et al.*, 2006). O consumo excessivo de etanol lesa imediatamente o sistema nervoso central, mas em longo prazo, também altera os sistemas genital masculino e feminino (Martinez *et al.*, 2001 a,b; Chuffa *et al.*, 2009). A ingestão crônica de etanol provoca alterações morfofisiológicas na próstata, que são caracterizadas por atrofia do epitélio (Martinez *et al.*, 2001), interrupção da homeostase estroma-epitélio e presença de células inflamatórias (Cândido *et al.*, 2007).

O etanol interfere no metabolismo e na concentração do retinol (vitamina A) e de seu metabólito, ácido retinóico, no plasma, fígado, hipocampo e testículo (Leo & Lieber, 1982; Kane *et al.*, 2009). O etanol diminui a concentração do ácido retinóico no fígado e aumenta a proliferação celular promovendo instabilidade genômica e neoplasia (Wang *et al.*, 1998). Deste modo, interferência do etanol no metabolismo do retinol e do ácido retinóico pode contribuir para a carcinogênese relacionada ao etanol (Seitz & Stickel, 2007; Wang *et al.*, 2005).

A oxidação do retinol gera primariamente dois ácidos, o *all-trans*-ácido retinóico (*atAR*) e o 9-*cis*-ácido retinóico. No entanto, o *atAR* é a forma mais abundante e a única detectável em condições normais da vitamina A (Heyman *et al.*, 1992; Dong & Zile, 1995). Eventos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose, são controlados pelo *atAR* por meio da ativação de seus receptores ($RAR\alpha$, $-\beta$ e $-\gamma$) (Kastner *et al.*, 1995; Fields, *et al.*, 2007).

O retinol e o ácido retinóico, contribuem para a diferenciação e manutenção da homeostase da próstata (Lasnitzki & Goodman, 1974; Prins & Putz, 2008) e regulam a

proliferação das células epiteliais da próstata em humano (Peehl *et al.*, 1993). Alterações na concentração do retinol, do ácido retinóico e na expressão dos RAR durante a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata, sugerem que alterações nessa via tem efeitos sobre as patologias dessa glândula (Richter *et al.*, 2002; Pasquali *et al.*, 1996; 1999).

Nosso objetivo foi avaliar se o consumo alto e baixo de etanol altera a concentração do retinol e do *atAR* no plasma e na próstata, a expressão dos RAR e o índice da proliferação celular e apoptose. Além disso, avaliar se há correlação da concentração do *atAR* com a proliferação celular e apoptose.

Materiais e métodos

Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 20 ratos machos UChA e 20 ratos machos UChB, pesando entre 280-350g (~ 90 dias de idade), obtidos do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP - Univ Estadual Paulista). A variedade UCh (Universidade do Chile) foi selecionada, a partir de ratos Wistar, para o consumo voluntário baixo (UChA – 0,5 a 1,9 ml/100 g peso corpóreo/dia) e alto (UChB – 2,0 a 6,0 ml/100 g peso corpóreo/dia) de solução de etanol a 10% (v/v) (Mardones & Segovia-Riquelmi, 1983). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10/grupo): UChA (consumo de etanol), UChACo (controle – ausência do consumo de etanol), UChB (consumo de etanol) e UChBCo (controle – ausência do consumo de etanol). Os ratos foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno em sala com temperatura (20 à 25°C) e ciclos de luz (12h-claro/12h-escuro) controlados. Todos os animais receberam, *ad*

libitum, dieta sólida da marca Nuvital[®] (Nuvilab CR-1) e água filtrada. Os grupos UChA e UChB receberam, adicionalmente, garrafa contendo solução de etanol diluído a 10% (10mL etanol/ 100mL água filtrada). O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-116/09).

Dieta líquida e sólida

A ingestão do etanol e o consumo da ração foram acompanhados semanalmente. A ingestão líquida avaliou o perfil de consumo das variedades UCh durante o período experimental. Baseado na quantidade de vitamina A, 25.500 UI, da ração Nuvilab CR-1, calculou-se a quantidade do retinol consumido (1UI=0,3 µg *all-trans*-retinol) (*Institute of Medicine*, 2000).

Preparação do tecido para análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e imuno-histoquímica

Os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue do tronco e os lobos dorsolaterais da próstata foram coletados após 60 dias de experimentação. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos e o plasma pipetado e congelado a -20°C para posterior análise. Devido à sensibilidade do retinol e do *atAR* à luz, todas as etapas (coleta, preparação da amostra e análises de HPLC) foram realizadas em sala escura e equipadas com luz amarela (Schmidt *et al.*, 2003). Os antímeros direitos dos lobos dorsolaterais foram pesados em balança analítica (OwaLabor, Oschatz, Germany) e as amostras dos tecidos foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C para análise da concentração

dos retinóides por HPLC. Os antímeros esquerdos dos lobos dorsolaterais das próstatas foram dissecados, separados em lobos dorsal e lateral, fixados em formaldeído 10% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e embebidos em paraplástico para análise imunohistoquímica e ensaio de TUNEL. As secções foram examinadas no microscópio Olympus BX-41 e as imagens capturadas por câmara digital DP-12 (Olympus, Inc., Japão).

Extração e quantificação do retinol e atAR por HPLC

Os antímeros direitos dos lobos dorsolaterais das próstatas (250 mg) foram homogeneizados em água deionizada e purificada (Millipore, Billerica, MA, USA) (1:1, w/w), utilizando homogeneizador de tecido (Ika, Staufen, Germany) (Schmidt *et al.*, 2003). O retinol foi extraído do plasma e da próstata (Arnaud *et al.*, 1991). A extração do atAR foi realizada segundo Kane *et al.* (2005). As amostras foram extraídas três vezes e os sobrenadantes foram retirados e evaporados no *Speed Vac* (Savant, Chandler, AZ, USA). As amostras contendo o retinol e o atAR foram ressuspensas em 100 µL de acetonitrila/diclorometano/metanol (70:20:10 v/v) e 100 µL de acetonitrila, respectivamente, e injetadas no HPLC (Varian 9012/9050). As amostras do retinol foram injetadas em coluna analítica C18, fase reversa, 5 µm (Chrompack Varian) e eluídas em fluxo de 1,2 ml/min. As amostras do atAR foram carregadas em coluna de fase reversa, 3 µm (Supersil ODS) e eluídas em fluxo de 0,5 ml/min. A concentração do retinol e do atAR foi mensurada usando padrões conhecidos e a área do pico foi detectada em 325 e 340 nm, respectivamente.

Imuno-histoquímica

Secções dos lobos dorsais e laterais (4 μm) de cinco animais de cada grupo experimental foram colocadas em lâminas preparadas com silano para a recuperação do antígeno. A exposição do epítipo das proteínas RARs foi realizada em forno microondas (tampão citrato de sódio, pH 6,0), em séries de 3x5 minutos, enquanto que a proteína Ki67 foi recuperada em panela de pressão, durante 30 minutos. Os anticorpos primários anti-RAR α diluído 1:50 (*Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, CA, USA), anti-RAR β , isoformas β 1 e β 2 (nucleares) e β 4 (citoplasmática) diluído 1:150 (*Abcam*, Inc., Cambridge, MA, USA), anti-RAR γ diluído 1:750 (*Imuny Biotechnology*, Paulínia, SP, Brasil) e anti-Ki67 diluído 1:100 (*Novocastra*, Newcastle, UK) foram colocados sobre as secções e incubados em câmara úmida a 4°C durante a noite. Os anticorpos primários anti-RAR α , β e γ foram detectados com polímero conjugado a peroxidase (*Novocastra*, Norwell, MA, USA). O anticorpo anti-ki67 foi detectado com anticorpo secundário biotilado (*Dako*, Denmark, Copenhagem) seguido por incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (*Vector Laboratory*, Burlingame, CA, USA). As secções foram reveladas com 3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorato (*Sigma*, USA) e contra-coradas com hematoxilina de Harris. Os controles negativos não usaram os anticorpos primários.

Deteção in situ da apoptose através do TUNEL

A detecção das células em apoptose foi baseada na reação *in situ* da enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) com o nucleotídeo biotilado para detecção de fragmentação do DNA (TUNEL). Utilizou-se o Kit FragELTM DNA (*Calbiochem*, La Jolla, CA, USA), segundo instruções do fabricante. As lâminas foram contra-coradas com

hematoxilina de Harris e montadas com Permount. Os controles negativos não foram incubados com a enzima TdT.

Análise estatística

As análises de HPLC, Ki-67 e TUNEL foram realizadas com a ANOVA, para um fator, seguidas pelo teste de Tukey. As proteínas RAR α , - β e - γ foram analisadas com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$. O programa da análise estatística foi o *InsTat*, versão 3.0 (*GraphPad, Inc.*, San Diego, CA, USA) e o *SigmaPlot*, versão 11.0, para o desenho gráfico (*Systat Software, Inc.*, Canadá, USA).

Resultados

Dieta líquida e sólida

O consumo de etanol e o retinol ingerido da ração foram mensurados durante o período experimental (**Tabela 1**). A média de ingestão de etanol do grupo UChB foi de 4,0 g/kg/dia e do UChA de 1,3 g/kg/dia. A quantidade do retinol consumido pelos grupos não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) (**Tabela 1**).

Concentração do retinol e do atAR no plasma e na próstata

O consumo alto de etanol diminuiu a concentração do retinol no plasma 1,8 vezes e não alterou na próstata (**Fig. 1A**). O consumo baixo de etanol diminuiu 1,3 vezes a concentração do retinol no plasma e não alterou na próstata (**Fig. 1B**). O consumo alto de

etanol diminuiu a concentração do retinol no plasma duas vezes comparado ao consumo baixo.

O consumo alto de etanol aumentou duas vezes a concentração do *atAR* no plasma e 2,4 vezes na próstata (**Fig. 2A**). O consumo baixo de etanol não alterou a concentração do *atAR* no plasma e na próstata (**Fig. 2B**).

Análise dos receptores de ácido retinóico (RAR α , - β e - γ)

Os RAR α e RAR β foram localizados nos lobos dorsais e laterais da próstata de todos os grupos experimentais, enquanto que o RAR γ foi encontrado apenas nos lobos dorsais. A tabela 2 apresenta a porcentagem de positividade dos RAR (α , β e γ) na próstata dos grupos experimentais. O RAR α não apresentou diferença significativa, localizando-se no núcleo das células luminais e basais da próstata dorsal e lateral (**Fig. 3, a-d e Fig. 4, a-d**).

O RAR β presente no núcleo e no citoplasma das células luminais e basais da próstata dorsal (**Fig. 3, e-h**) e no citoplasma e no núcleo das células basais da lateral (**Fig. 4, e-h**). O RAR β na próstata dorsal e lateral foi menor do que o RAR α . O consumo alto de etanol aumentou o RAR β na próstata dorsal comparado ao UChBCo e UChA (**Tabela 2**).

O RAR γ observado no núcleo e no citoplasma das células luminais e basais do lobo dorsal e ausente no lateral (**Fig. 3, i-l e Fig. 4, i-l**). O consumo alto de etanol aumentou o RAR γ na próstata dorsal comparado ao controle (**Tabela 2**). Não houve diferença significativa do RAR γ nos grupos UChA (**Tabela 2**).

Proliferação celular e apoptose

O índice da proliferação celular (**Fig. 5**) e da apoptose (**Fig. 6**) não apresentou diferença significativa entre os grupos. Os índices de proliferação celular e de apoptose da próstata dos grupos experimentais estão apresentados na **Figura 7**.

Discussão

A quantidade de etanol ingerida pelos grupos UChA e UChB mantiveram-se dentro do padrão de ingestão das variedades (Quintanilla *et al.*, 2006). Os grupos experimentais não apresentaram diferença no consumo de retinol, portanto, o resultado da concentração do retinol e do seu metabólito, *atAR*, não foi consequência do consumo. Nossos resultados sugerem que o etanol diminua a concentração do retinol no plasma proporcionalmente a quantidade de etanol ingerida. O aumento da mobilização dos ésteres de retinol, forma de estocagem do retinol, do fígado para a circulação e posterior distribuição do retinol a outros tecidos ou o aumento do metabolismo do retinol, gerando metabólitos polares, podem resultar na diminuição do retinol no plasma após exposição crônica ao etanol (Sato & Lieber, 1981; Grummer & Erdman, 1983).

O consumo crônico de etanol pode aumentar o retinol em alguns tecidos (Leo *et al.*, 1986; Mobarhan *et al.*, 1991). O aumento na expressão do STRA6 e da CRBPI foi sugerido como mecanismo para o aumento do retinol no hipocampo após exposição ao etanol (Kane *et al.*, 2009). Do mesmo modo, o aumento da concentração do retinol na próstata durante a hiperplasia prostática benigna (HPB) comparada à próstata normal e ao câncer de próstata parece ocorrer devido à alta concentração da CRBP (Pasquali *et al.*, 1996). No entanto, não encontramos alteração na concentração do retinol na próstata após o consumo de etanol,

sugerindo que o etanol não altera a expressão das proteínas envolvidas na homeostase do retinol nessa glândula.

Nossos resultados demonstram que o consumo alto de etanol aumenta a concentração do *atAR* no plasma, o qual possivelmente tenha ocorrido devido ao aumento do metabolismo do retinol (Grummer & Erdman, 1983; Kane *et al.*, 2009). A concentração do *atAR* também aumenta na próstata com o consumo alto de etanol, neste caso, sugerimos que o etanol esteja interferindo no catabolismo ou na síntese do *atAR* através das enzimas *Raldh1* e/ou *CYP*. O aumento da atividade da *Raldh1* pode contribuir para o aumento do *atAR* estimulado pelo etanol crônico (Kane *et al.*, 2009). As enzimas do citocromo P450 (*CYP26A1*, *CYP26B1* e *CYP2C39*) catabolizam o *atAR*. Em alguns locais, o etanol induz as enzimas envolvidas no catabolismo do *atAR* fazendo com que ele retorne as concentrações normais (Kane *et al.*, 2009). Por outro lado, supomos que o consumo baixo de etanol não seja suficiente para alterar as enzimas envolvidas com a síntese e o catabolismo do *atAR* no plasma e na próstata.

O *atAR* modula a expressão gênica e controla o crescimento celular, a diferenciação epitelial e a apoptose através dos *RARs* (Aboseif *et al.*, 1997; Fields *et al.*, 2007). A expressão dos receptores do ácido retinóico depende da quantidade de retinóides na próstata (Pasquali *et al.*, 1996, 1999). O consumo alto de etanol aumentou a concentração do *atAR* na próstata dorsolateral e o sinal positivo do *RARβ* e do *RARγ* na próstata dorsal, no entanto, não alterou o *RARα* na próstata dorsal e lateral em nenhum dos grupos. De The *et al.* (1989) e Jones *et al.* (1997) não encontraram diferenças na expressão dos *RARα* após tratamento com o ácido retinóico. O aumento na concentração do *atAR* pode estimular diferentemente seus receptores, sendo o *RARα* mais resistente à sensibilização.

Os hormônios esteróides também regulam a expressão dos RARs (Prins *et al.*, 2002). Huang *et al.* (1997) notaram aumento na expressão dos RAR α e $-\gamma$ na próstata após a castração, prevenindo o aumento com a reposição da testosterona. A exposição ao etanol diminui a concentração da testosterona em ratos Wistar (Salonen & Huhtaniemi, 1990) e nas variedades UChA e UChB (Martinez *et al.*, 1999). Embora a diminuição da testosterona pareça aumentar a expressão dos RARs, observou-se aumento dos RAR β e $-\gamma$ apenas na próstata do UChB. Portanto, a concentração do *atAR* e não a testosterona tenha aumentado os RAR β e $-\gamma$, tornando a próstata dorsal mais sensível à ação do *atAR*.

Alterações dos RARs podem indicar crescimento celular desregulado ou transformação tumorigênica das células epiteliais da próstata (Richter *et al.*, 2002). O RAR β é ausente no câncer de próstata (Lotan *et al.*, 2000), porém aumenta na HPB (Richter *et al.*, 2002). O RAR γ também aumenta na HPB, porém não se altera na neoplasia intra-epitelial e nos tumores de baixo grau. Os RARs podem distinguir os tumores benignos dos malignos (Richter *et al.*, 2002).

As alterações dos RAR β e $-\gamma$ na próstata dorsal do UChB são semelhantes às observadas na HPB. Adicionalmente, como ocorreu durante o consumo alto de etanol, a concentração do ácido retinóico também aumenta na HPB (Pasquali *et al.*, 1996). Portanto, as alterações dos RAR β e $-\gamma$ e da concentração do *atAR* provocadas pelo consumo alto de etanol na próstata são semelhantes às mudanças observadas na HPB. É possível que o consumo alto de etanol e a HPB altere a homeostase prostática por uma mesma via ou vias semelhantes, produzindo padrões de resposta sobre a próstata.

A manutenção da homeostase do *atAR* é importante, pois vias celulares como proliferação celular, diferenciação e apoptose são influenciadas dependendo de sua

concentração (De Luca, 1991). O ácido retinóico é importante para o desenvolvimento, diferenciação (Lasnitzki & Goodman, 1974; Vezina *et al.*, 2008) e manutenção da homeostase das células do epitélio da próstata no adulto (Prins & Putz, 2008). O consumo de etanol diminui a concentração do *atAR*, resultando em aumento da proliferação celular no fígado (Wang *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001). Nossos resultados mostram que o consumo alto de etanol aumenta a concentração do *atAR* na próstata, porém sem alteração da proliferação celular. O aumento do *atAR*, possivelmente, não foi suficiente para provocar a alteração da proliferação celular.

Embora os índices da proliferação celular não tenham apresentado diferença significativa, o consumo alto de etanol apresenta maior índice da proliferação celular no lobo dorsal da próstata. O etanol foi apontado como desencadeador da proliferação epitelial focal na próstata ventral de ratos UChB (Cândido *et al.*, 2007). Além disso, o etanol e o acetaldeído induzem a transcrição da proteína ativadora da proliferação-1, *in vitro*, resultando em aumento da proliferação celular (Casini *et al.*, 1994). Sugerimos que o consumo alto de etanol aumenta o índice da proliferação celular no lobo dorsal, sendo mais sensível ao etanol do que a próstata lateral.

O consumo alto e baixo de etanol não alterou os índices de apoptose das células epiteliais da próstata, semelhante à Cagnon *et al.* (2001). Adicionalmente, não há relação entre o aumento da concentração do *atAR* e o índice de apoptose. Por outro lado, o ácido retinóico é apontado como agente quimioterápico por induzir apoptose e a diferenciação celular em tumores (Pahlman *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1996; Leithner *et al.*, 2000). Altas concentrações de ácido retinóico são utilizadas para a indução da apoptose (Liu *et al.*, 1996; Cañon *et al.*, 2004; Cerniano *et al.*, 2008). Sugerimos que o aumento da concentração do

atAR não seja suficiente para interferir na regulação da apoptose. Contudo, a alteração da concentração do *atAR* e dos seus RARs durante o consumo alto de etanol merecem atenção e devem ser alvo de futuras investigações.

Conclui-se que o etanol altera a concentração do retinol e do *atAR* no plasma de forma diretamente proporcional à quantidade de etanol consumida. Enquanto que na próstata, a concentração do retinol não é alterada pelo etanol. O consumo alto de etanol aumenta a concentração do *atAR* na próstata dorsolateral e a expressão dos RAR β e γ na próstata dorsal. Os índices de proliferação celular e apoptose da próstata não se alteram com o consumo de etanol e não apresentam correlação com a concentração do *atAR*.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES pelo apoio financeiro para execução deste trabalho.

Referências

1. Aboseif AR, Dahiya R, Narayan P, Cunha GR. Effect of Retinoic Acid on Prostatic Development. *The Prostate*. 1997,31:E161-7.
2. Aggarwal S. *et al.* Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2006, 17:E566-75.
3. Arnaud J, Fortis I, Blachier D, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1991,572:E102-16.
4. Cagnon VHA, Tomazini FM, Garcia PJ, Martinez FE, Martinez M, Padovani CR. Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57B1/6J) submitted to chronic alcohol ingestion. *Tissue & Cell*. 2001, 33:E354-60.
5. Cândido EM, Carvalho CAF, Martinez FE, Cagnon VHA. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biol. Intern.* 2007, 31: E459-72.
6. Casini A, Galli G, Salzano R, Ceni E, Franceschelli F, Rotella CM, Surrenti C. Acetaldehyde induces c-Fos and c-Jun proto-oncogenes in fat-storing cell cultures through protein kinase C activation. *Alcohol Alcohol*. 1994, 29:E303-14.
7. Cerniano G, Brandmaier P, Scholz G, Ackermann OP, Alt R, Rothe K, Cross M, Witzigmann H. All-trans-retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *Journal of Pediatric Surgery*. 2008, 43:E1284-94.

8. Chuffa LG, Padovani CR, Martinez FE. Ovarian structure and hormonal status of the UChA and UChB adult rats in response to ethanol. *Maturitas*.2009,62:E21-9.
9. Chung J, Liu C, Smith DE, Seitz HK, Russell RM, Wang XD. Restoration of retinoic acid concentration supresses ethanol enhanced c-Jun expression and hepatocyte proliferation in rat liver. *Carcinogenesis*. 2001,22:E1213–19.
10. De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J*. 1991,5:E2924–33.
11. De The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptora andb genes.*Emboj*. 1989, 8:E429-33.
12. Dolle P, Ruberte E, Leory P, Morriss-Kay G, Chambon P. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development*. 1990, 110:E1133-51.
13. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor super family. *Science*. 1988, 240:E889-95.
14. Fields AL, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids in Biological Control and Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007, 102:E886-98.
15. Grummer MA, Erdman JW. Effect of chronic alcohol consumption and moderate fat diet on vitamin A status in rats fed either vitamin A or beta-carotene. *J. Nutr*. 1983,113:E350-64.
16. Huang HFS, Li M-t, Hagen SV, Zhang YF, Irwin RJ. Androgen Modulation of the Messenger Ribonucleic Acid of Retinoic Acid Receptors in the Prostate, Seminal Vesicles, and Kidney in the Rat. *Endocrinology*. 1997, 138:E553-9.

17. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: 2000.
18. Jones HE, Eaton CL, Barrow D, Dutkowski C, Griffiths K. Response of Cell Growth and Retinoic Acid Receptor Expression to Retinoic Acid in Neoplastic and Non-Neoplastic Prostate Cell Lines. *The Prostate*. 1997, 30:E174-182.
19. Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem. J.* 2005,388:E363-69.
20. Kane MA, Folias AE, Wang C, Napoli JL. Ethanol elevates physiological all-*trans*-retinoic acid levels in select loci through altering retinoid metabolism in multiple loci: a potential mechanism of ethanol toxicity. *Faseb J.* 2009,24.
21. Kastner P. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXR beta and alpha lead to differentiation of embryonic cardiac cardiomyocytes. *Development*. 1997, 124:E4749-58.
22. Lasnitzki I, Goodman DS. Inhibition of the effects of methylcholanthrene on mouse prostate in organ culture by vitamin A and its analogs. *Cancer Res.* 1974,34:E1564-71.
23. Leithner A, Schnack B, Katterschafka T, Wiltschke C, Amann G, Windhager R. Treatment of extra-abdominal desmoids tumors with interferon-alpha with or without tretinoin. *Journal of Surgical Oncology* 2000, 73(1): 21-25.
24. Leo MA, Kim C, Lieber CS. Increased vitamin A in esophagus and other extrahepatic tissues after chronic ethanol consumption in the rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1986,10:E487-92.

25. Liu M, Lavarone A, Freedman LP. Transcriptional activation of the human p21 (WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 1996; 271: 31723-28.
26. Lotan Y, Xu XC, Shalev M, Lotan R, Williams R, Wheeler TM, Thompson TC, Kadmon D. Differential Expression of Nuclear Retinoid Receptors in Normal and Malignant Prostates. *Journal of Clinical Oncology*. 2000, 18:E116-21.
27. Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol. Teratol.* 1983,5:E 171-8.
28. Martinez FE, Laura IA, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregon E. 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.* 2001a, 33:E99-106.
29. Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregon E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2000,32:E1751-84.
30. Martinez M, Mattos ECT, Mello Jr W, Cagnon VHA, Martinez FE. Morphology of the seminal vesicle of *Calomys callosus* submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2001b,33:E453-61.
31. McCaffery P, Koul O, Smith D, Napoli JL, Chen N, Ullman MD. Ethanol increases retinoic acid production in cerebellar astrocytes and in cerebellum. *Developmental Brain Research.* 2004, 153:E233-41.
32. Mobarhan S, Seitz HK, Russell RM, Mehta R, Hupert J, Friedman H, Layden TJ, Meydani M, Langenberg P. Age-Related Effects of Chronic Ethanol Intake on Vitamin A Status in Fisher 344 Rats. *J. Nutr.* 1991,121:E510-7.

33. Montico F, Fávoro WJ, Cândido EM, Martinez M, Pinheiro PF, Martinez FE, Cagnon VH. Alcoholism and coagulating gland: androgen and insulin like growth factor-1 receptor features. *Tissue Cell*. 2010, 42(4):203-10.
34. Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell differentiation* 1984; 14:135-144.
35. Pasquali D, Rossi V, Prezioso D, Gentile V, Colantuoni V, Lotti T, Bellastella A, Sinisi AA. Changes in tissue transglutaminase activity and expression during retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in primary cultures of human epithelial prostate cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999, 84:E1463-69.
36. Pasquali D, Thaller C, Eichele G. Abnormal level of retinoic acid in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996,81:E2186–91.
37. Peehl DM, Wong ST, Stamey TA: Vitamin A regulates proliferation and differentiation of human prostatic epithelial cells. *Prostate*.1993, 23:E69-78.
38. Prins GS & Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. 2008, 76(6):E641–59.
39. Prins GS, Chang WY, Wang Y, Breemen RBV. Retinoic Acid Receptors and Retinoids Are Up-Regulated in the Developing and Adult Rat Prostate by Neonatal Estrogen Exposure. *Endocrinology*. 2002, 143:E3628-40.
40. Quintanilla ME, Israel Y, Sapag A, Tampier L. The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addict. Biol*. 2006,11:E310-23.

41. Rehm J, Taylor B, Room R. Global burden of disease from alcohol, illicit drugs and tobacco. *Drug Alcohol Rev.* 2006, 25:E503-13.
42. Richter F, Joyce A, Fromowitz F, Wang S, Watson J, Watson R, Irwin RJ Jr, Huang HF. Immunohistochemical localization of the retinoic acid receptors in human prostate. *J Androl.* 2002, 23:E830-8.
43. Salonen I, Huhtaniemi I. Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat. *Biol Reprod.* 1990, 42:E55-62.
44. Sato M, Lieber CS. Hepatic vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. *J. Nutr.* 1981, 111:E2015-23.
45. Schmidt CK, Brouwer A, Nau H. Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. *Analytical Biochemistry.* 2003,315:E36-48.
46. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcoholmediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2007,7:E599–612.
47. Vezina CM, Allgeier SH, Fritz WA, *et al.* Retinoic Acid Induces Prostatic Bud Formation. *Dev Dyn.* 2008; 237(5):1321-33.
48. Wang XD, Liu C, Chung J, Stickel F, Seitz HK, Russell RM. Chronic alcohol intake reduces retinoic acid concentration and enhances AP-1 (c-Jun and c-Fos) expression in rat liver. *Hepatology,* 1998;28(3):744-50.
49. Wang XD. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol.* 2005,35:E251-8.

Tabela 1. Consumo relativo de etanol e de ração (g/Kg/dia) e de retinol ($\mu\text{g/Kg/dia}$)¹.

Grupos	Dieta líquida e sólida ²		
	Etanol	Ração	Retinol
UChA	1,3 \pm 0,11	82,1 \pm 1,2	0,63 \pm 0,05
UChA Co	----	83,0 \pm 3,1	0,63 \pm 0,03
UChB	4,0 \pm 0,3	86,3 \pm 5,8	0,66 \pm 0,14
UChB Co	----	73,3 \pm 2,7	0,57 \pm 0,08

¹Os dados são expressos em média \pm EPM (n=10/grupo). Os resultados foram avaliados por ANOVA *one-way*, seguidos pelo teste de Tukey para as diferenças entre as médias.

²O consumo de ração e de retinol pelos grupos experimentais apresentaram $P > 0,05$.

Tabela 2. Índice dos receptores de ácido retinóico (RAR) na próstata dos ratos UCh¹.

Receptor	Grupos							
	UChB		UChBCo		UChA		UChACo	
	PD (%)	PL (%)	PD (%)	PL (%)	PD (%)	PL (%)	PD (%)	PL (%)
RAR α	81 \pm 13	85 \pm 11	83 \pm 9	83 \pm 6	75 \pm 9	81 \pm 9	66 \pm 11	63 \pm 24
RAR β	26 \pm 7	15 \pm 5	6 \pm 4**	13 \pm 4	7 \pm 1**	7 \pm 0.9	18 \pm 5	11 \pm 3
RAR γ	25 \pm 10	NL	5 \pm 1**	NL	16 \pm 6	NL	8 \pm 3	NL

¹Os dados são expressos em mean \pm SD (n=5/grupo). UChB (PD) X UChBCo (PD), UChB (PD) X UChA (PD). **P < 0.01.

PD (próstata dorsal), PL (próstata lateral) e NL (não localizado).

Figura 1. Quantificação do retinol por HPLC em ratos UCh. Ratos UChB (A) e UChA (B). Os valores são expressos em Média \pm EPM (n=10). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

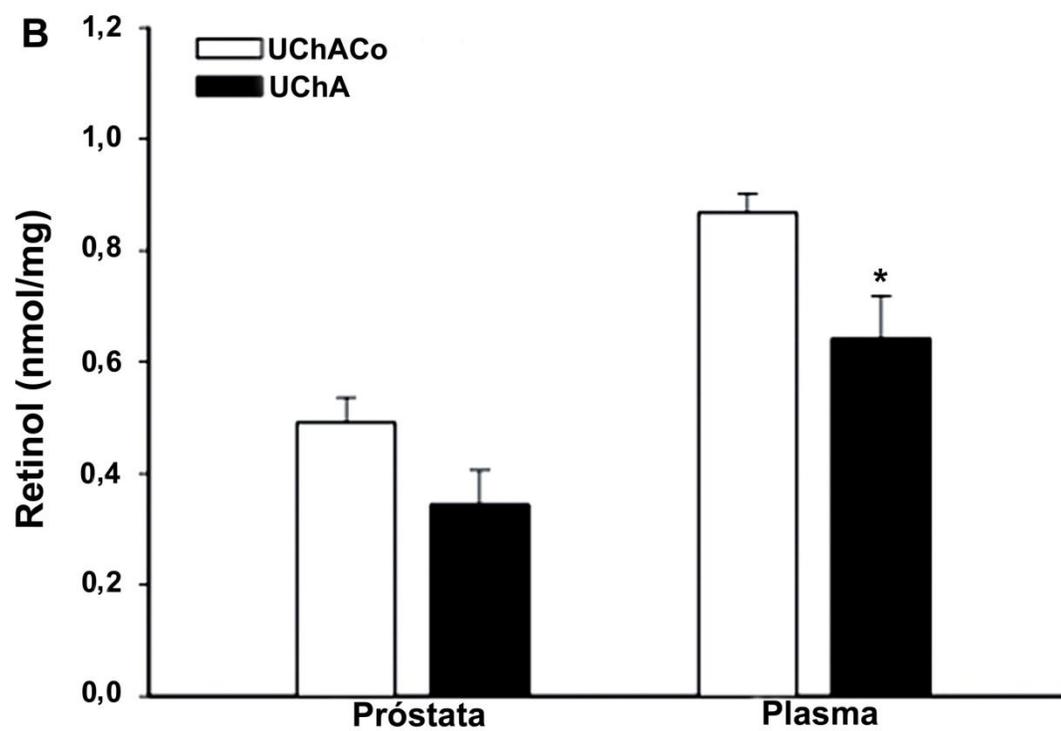
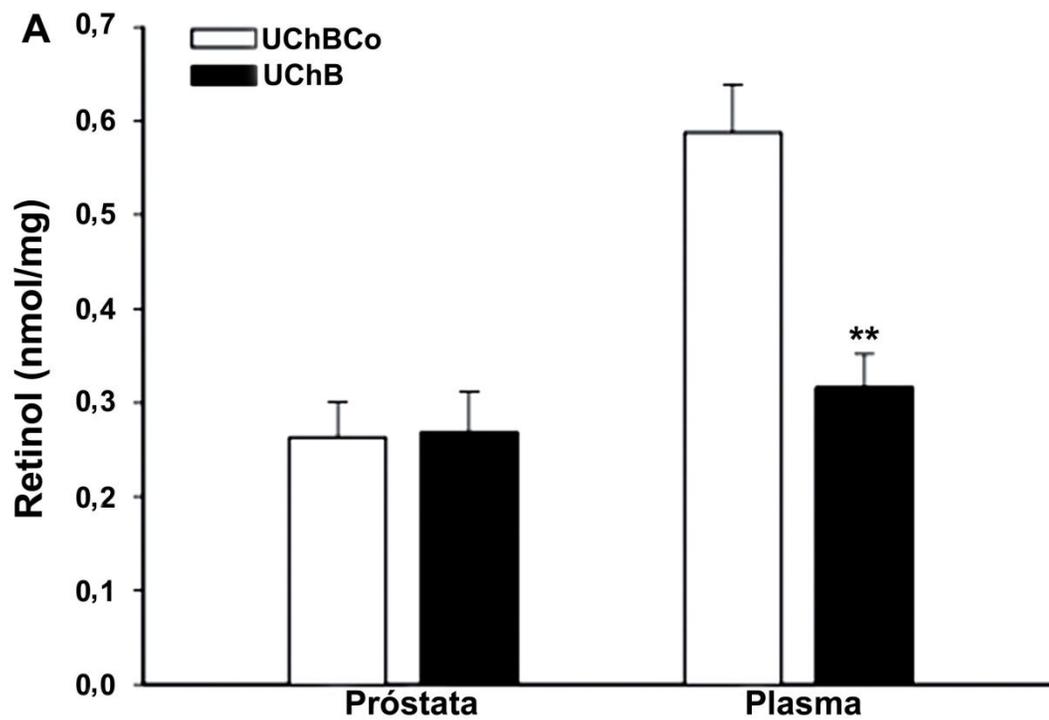


Figura 2. Quantificação do *all-trans*-ácido retinóico por HPLC em ratos UCh. Ratos UChB (A) e UChA (B). Os valores são expressos em Média \pm EPM (n=10).
* $P < 0,05$.

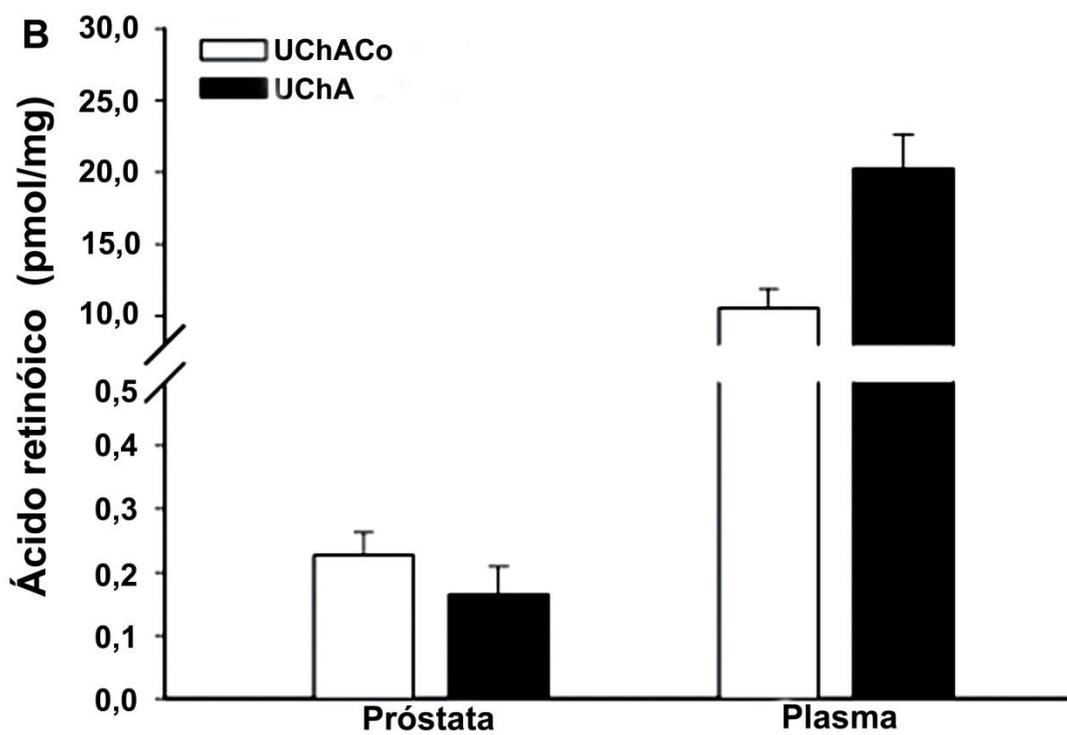
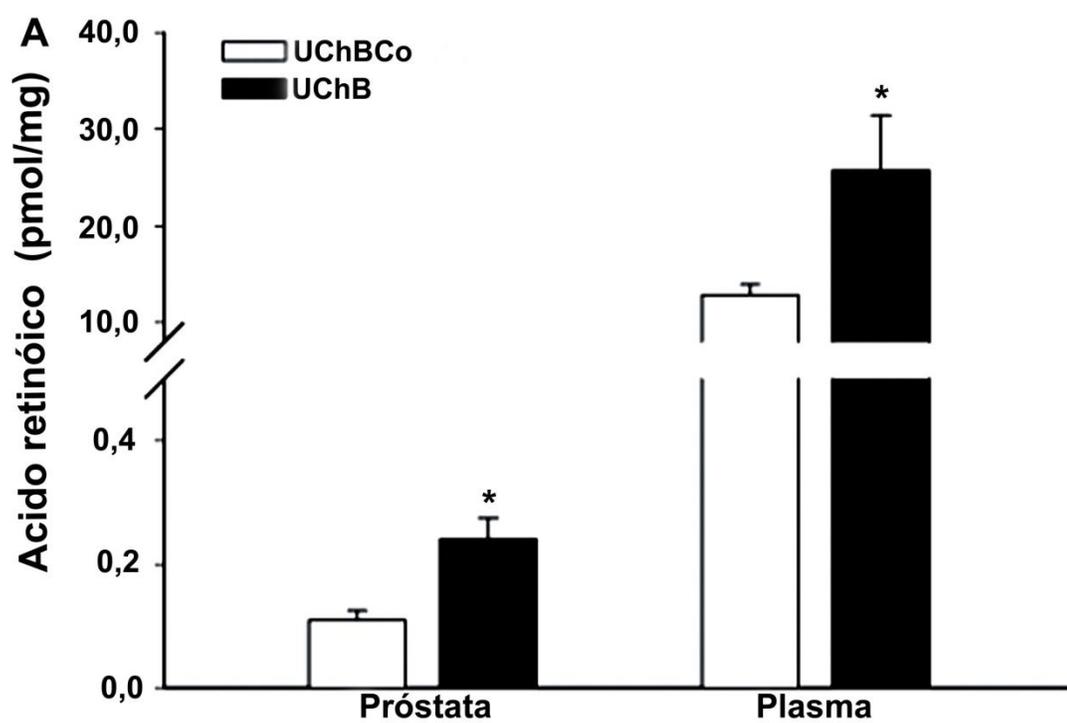


Figura 3. Localização dos receptores do ácido retinóico (α , β e γ) no lobo dorsal da próstata de ratos UCh. RAR α (a-d), RAR β (e-h) e RAR γ (i-l). Barras: 20 μ m.

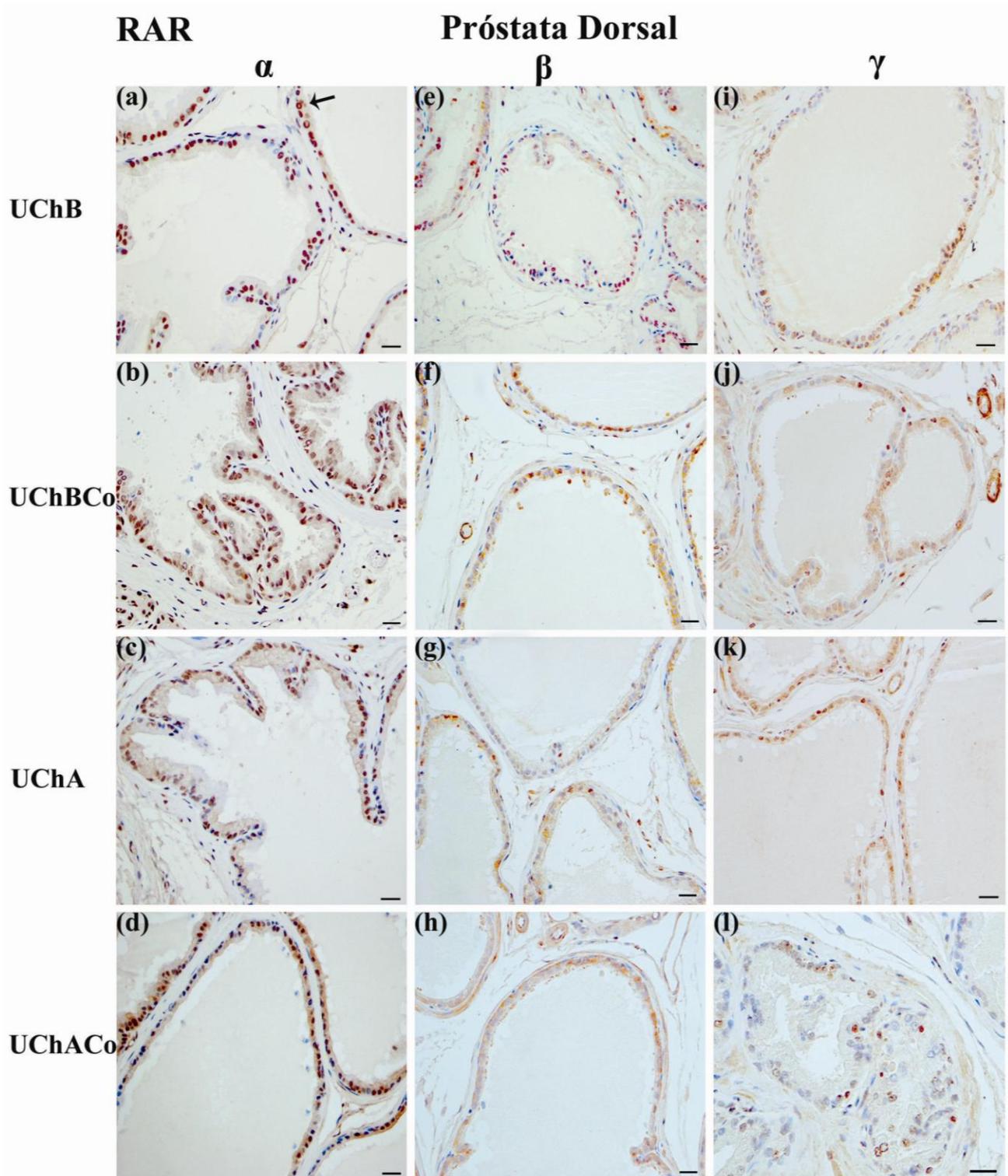


Figura 4. Localização dos receptores do ácido retinóico (α , β e γ) no lobo lateral da próstata de ratos UCh. RAR α (a-d), RAR β (e-h) localizado no núcleo e no citoplasma das células basais (cabeça de seta) e RAR γ (i-l) ausente. Barras: 20 μ m.

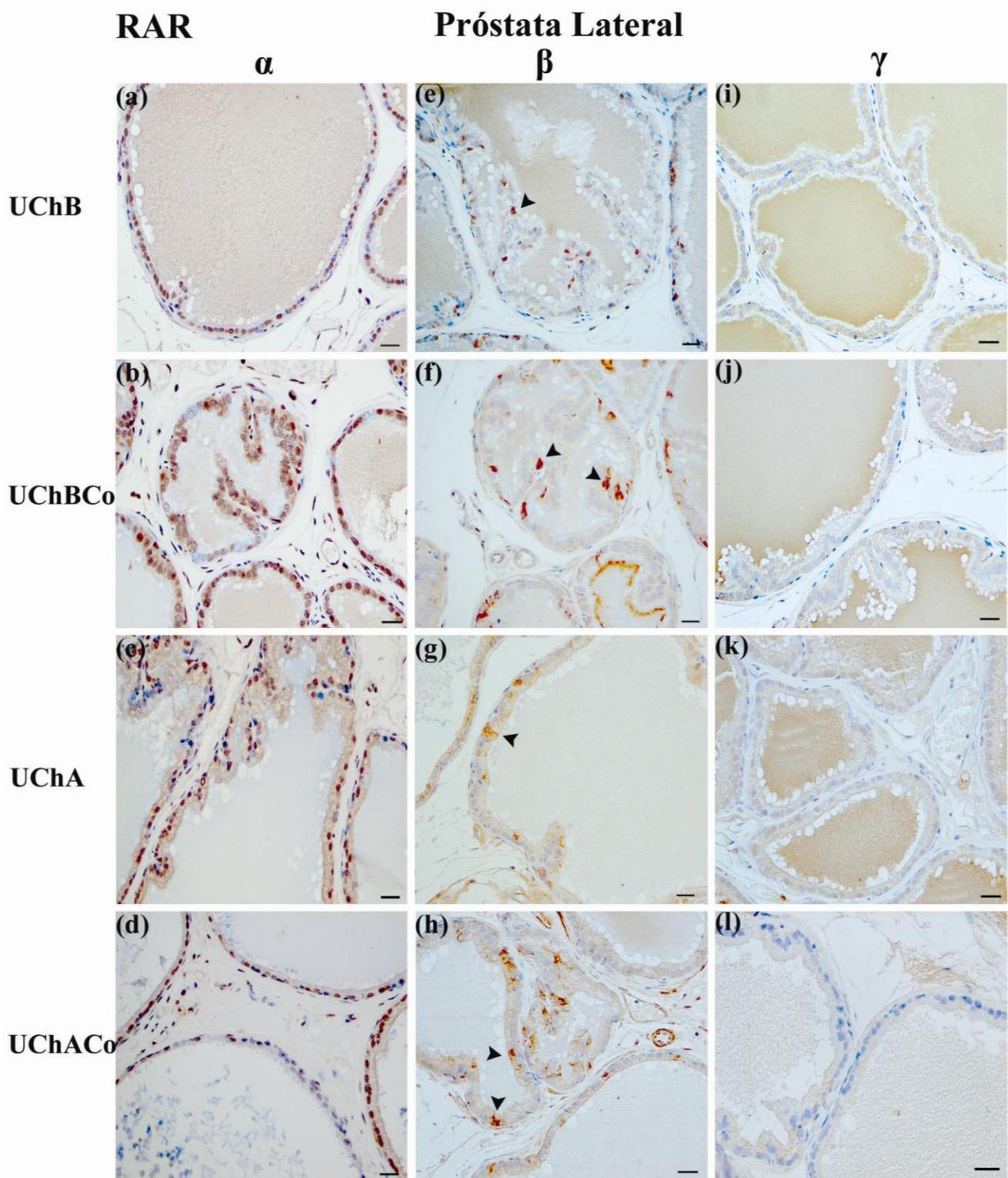


Figura 5. Proliferação celular nos lobos dorsais e laterais da próstata de ratos UCh.
Imunohistoquímica da proteína Ki-67 na próstata dorsal (a-d) e na lateral (e-h). Setas indicam o sinal positivo da proteína. Barras: 20 μ m.

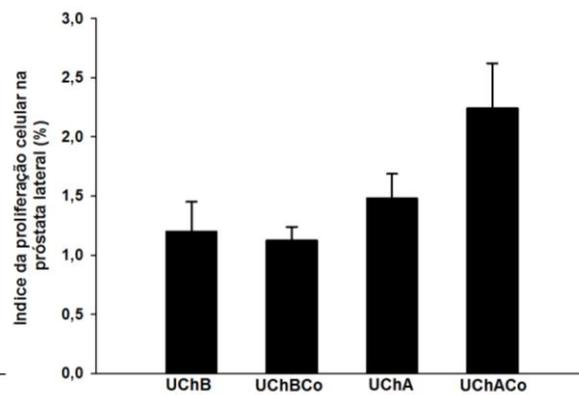
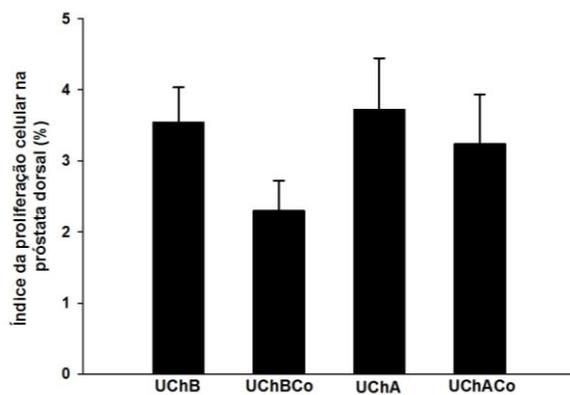
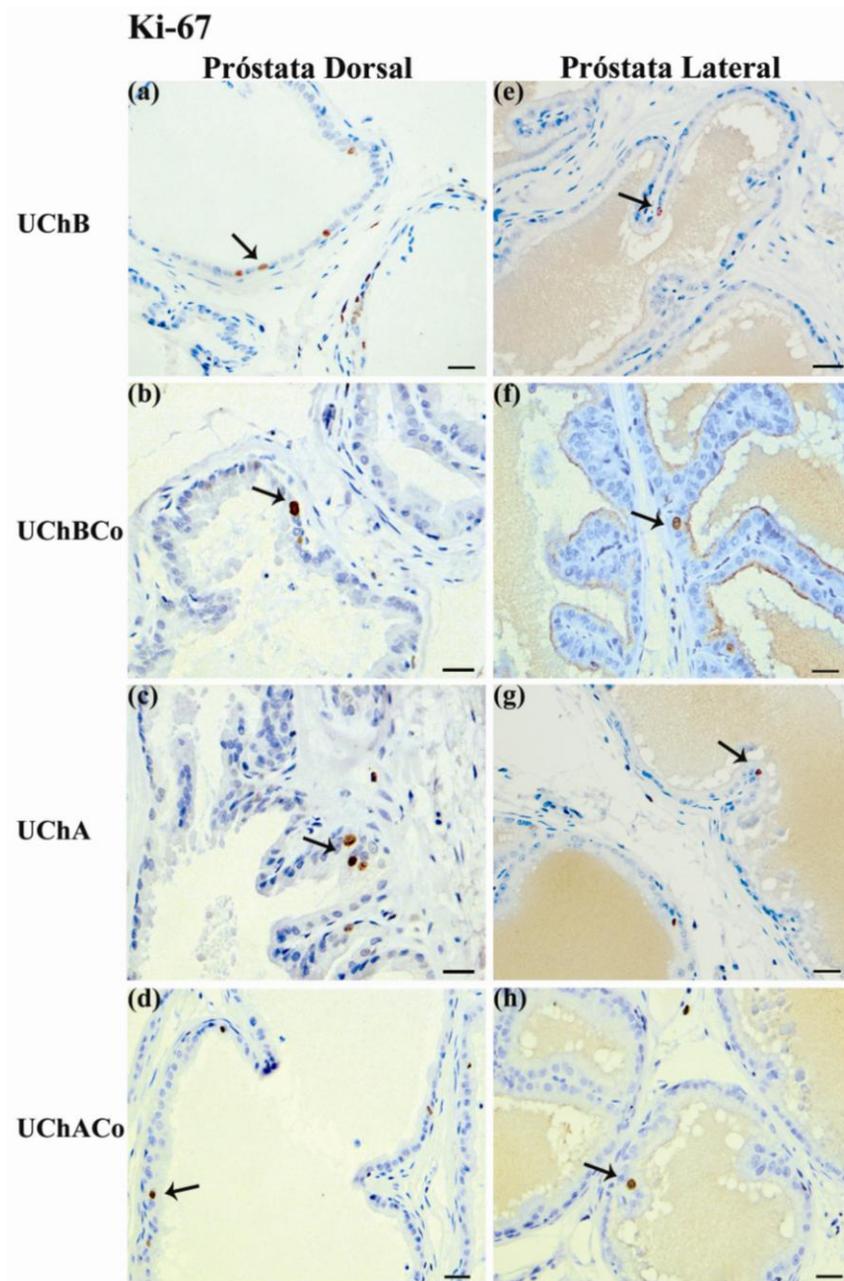
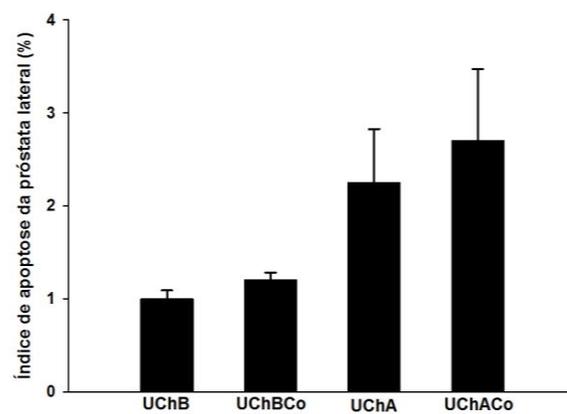
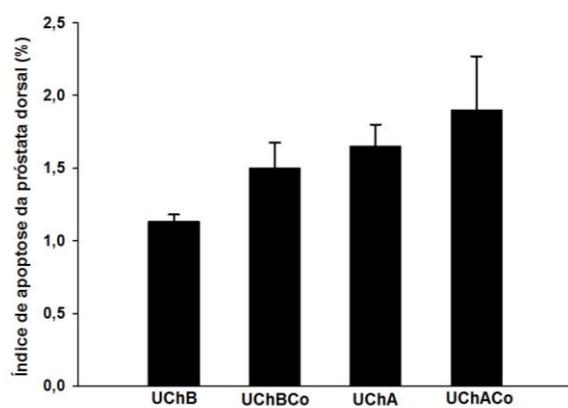
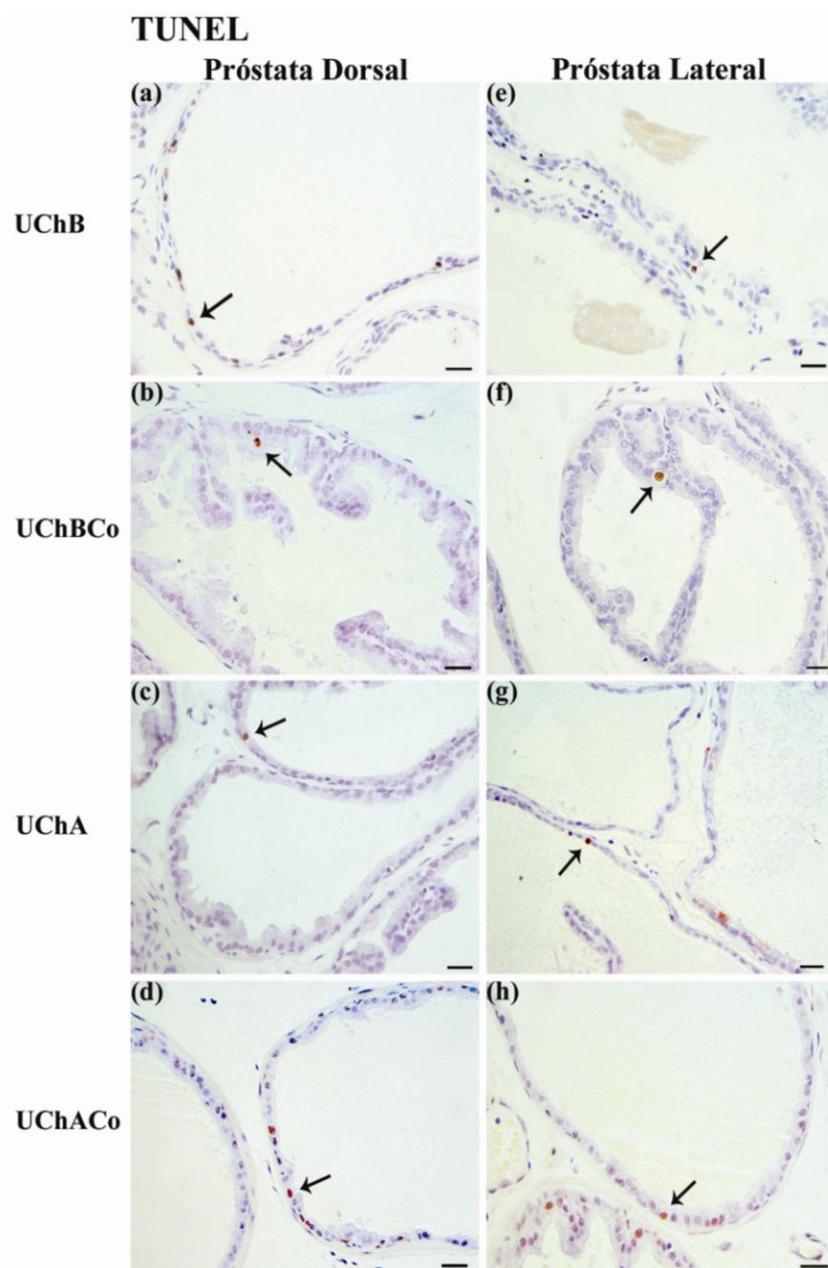


Figura 6. Apoptose nos lobos dorsais e laterais da próstata de ratos UCh. Setas indicam apoptose na próstata dorsal (a-d) e na lateral (e-h). Barras: 20 μ m.



Conclusões Finais

Conclui-se que o etanol altera a concentração do retinol e do *atAR* no plasma de forma diretamente proporcional à quantidade de etanol consumida. Enquanto que na próstata, a concentração do retinol não é alterada pelo etanol. O consumo alto de etanol aumenta a concentração do *atAR* na próstata dorsolateral e a expressão dos RAR β e γ na próstata dorsal. Os índices de proliferação celular e apoptose da próstata não se alteram com o consumo de etanol e não apresentam correlação com a concentração do *atAR*.

Referências da Introdução Geral

- . Aboseif AR, Dahiya R, Narayan P, Cunha GR. Effect of Retinoic Acid on Prostatic Development. *The Prostate*. 1997,31:E161-7.
- . Aggarwal S. *et al.* Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2006, 17:E566-75.
- . Aumüller, G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat. Embryol*, 1989,179:E519-31.
- . Bagnardi V, Blangiardo M, Vecchia CL, Corrao G. Alcohol consumption and the risk of cancer: a metaanalysis. *Alcohol Res. Health*. 2001, 25:263-70.
- . Cândido EM, Carvalho CAF, Martinez FE, Cagnon VHA. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biol. Intern*. 2007; v. 31: 459-472.
- . Chuffa LG, Padovani CR, Martinez FE. Ovarian structure and hormonal status of the UChA and UChB adult rats in response to ethanol. *Maturitas*.2009,62:E21-9.
- . Chung J, Liu C, Smith DE, Seitz HK, Russell RM, Wang XD. Restoration of retinoic acid concentration supresses ethanolenhanced c-Jun expression and hepatocyte proliferation in rat liver. *Carcinogenesis*. 2001, 22:1213–19.
- . De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J*. 1991, 5:E2924-33.
- . Deltour L, Ang HL, Duester G. *FASEB J*. 1996, 10:E1050-7.

- . Duester G. Are ethanol-induced birth defects caused by functional retinoic acid deficiency? in: R. Blomhoff (Ed.), *Vitamin A in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, 1992:343-64.
- . Duester G. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267:E4315-24.
- . Duester G. Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem Biol Interact.* 2001, 130:E469-80.
- . Edenberg HJ, Strother WN, Mcclintick JN, Tian H, Stephens M, Jerome RE, Lumeng L, LI TK, McBride WJ. Gene expression in the hippocampus of inbred alcohol-preferring and nonpreferring rats. *Genes, Brain, & Behavior.* 2005,4:E20-30.
- . Fields AL, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids in Biological Control and Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2007, 102:E886-98.
- . Galvão-Teles A, Anderson DC, Burke CW, Marshall JC, Corker CS, Brown RL, Clark ML. Biologically active androgens and estradiol in men with chronic liver disease. *Lancet.* 1973, 1:E173-7.
- . Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson CB, Hakansson H, Sauvant P, Azais-Braesco V, Frasson M, Picaud S, Chambon P. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *Embo J.* 1999,18:E4903-14.
- . Grummer MA, Langhough RE, Zachman RD. Maternal ethanol ingestion effects on fetal rat brain vitamin A as a model for fetal alcohol syndrome. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 1993, 17:E592-7.
- . Guess HA. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol. Rev.* 2001, 23:E152-8.

- . Hazem R, Ismail A, Landry F, Aprikian AG, Chevalier S. Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *The Prostate*. 2002, 51:E117-25.
- . Hirata ES, Hirata LCM. Bioquímica e metabolism do etanol. In: Fortes JRA, Cardo WN. *Alcoolismo: diagnostic e tratamento*. São Paulo: Sarvier, p:57-64, 1991.
- . Huang HF, Dyrenfurth I, Hembree WC. Endocrine changes associated with germ cell loss during vitamin A-induced recovery of spermatogenesis. *Endocrinology*. 1983, 112:E1163-71.
- . Kane MA, Folias AE, Wang C, Napoli JL. Ethanol elevates physiological all-*trans*-retinoic acid levels in select loci through altering retinoid metabolism in multiple loci: a potential mechanism of ethanol toxicity. *Faseb J*. 2009,24.
- . Krulewitch CJ. Alcohol consumption during pregnancy. *Annu. Rev. Nurs. Res.* 2005, 23:101-34.
- . Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular Matrix. *FEBS Lett*. 1990, 268:386-93.
- . Lasnitzki I, Goodman DS. Inhibition of the effects of methylcholanthrene on mouse prostate in organ culture by vitamin A and its analogs. *Cancer Res*. 1974; 34: 1564-71.
- . Lieber CS. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Sem.Liver Dis*. 1993,13:E136-53.
- . Lieber CS, De Carli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J. Hepathol*. 1991,12:E394-01.
- . Liu C, Russell RM, Seitz HK, Wang XD. Ethanol enhances retinoic acid metabolism into polar metabolites in rat liver via induction of cytochrome P4502E1. *Gastroenterology*. 2001, 120:E179-189.

- . Lotan Y, Xu XC, Shalev M, Lotan R, Williams R, Wheeler TM, Thompson TC, Kadmon D. Differential Expression of Nuclear Retinoid Receptors in Normal and Malignant Prostates. *Journal of Clinical Oncology*. 2000, 18:E116-21.
- . MacDonald PN, ONG DE. Evidence of lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 1988, 263:E12478-82.
- . Mao, G.E. Decreased Retinoid X Receptor-A Protein Expression in Basal Cells Occurs in the Early Stage of Human Prostate Cancer Development. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004, 13:E383-90.
- . Marks V, Wright J. Metabolic effects of alcohol. *Clin Endocrinol Metab*. 1978, 7:E245-466.
- . Martinez FE, Laura IE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregón E. Morphology of the ventral lobe of the prostate and seminal vesicle in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*. 2001a, 33:E99-106.
- . Martinez M, Mattos ECT, Mello Jr W, Cagnon VHA, Martinez FE. Morphology of the seminal vesicle of *Calomys callosus* submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2001b,33:E453-61.
- . McCaffery P, Koul O, Smith D, Napoli JL, Chen N, Ullman MD. Ethanol increases retinoic acid production in cerebellar astrocytes and in cerebellum. *Developmental Brain Research*. 2004, 153:E233-41.
- . McCaffery PJ, Adams J, Maden M, Rosa-Molinar E. Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur. J. Neurosci*. 2003, 18:E457-72.

- . Miano JM, Berk BC. Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circulation Research*. 2000, 87:355-62.
- . Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J*. 1996, 10:E993-1001.
- . Narbaitz R. Embryology, anatomy and histology of the male sex accessory glands. In: Brandes D, editor. *Male sex accessory organs*. New York: Academic Press, 1975, p3-15.
- . Olson JA. Vitamin A. In: *Present knowledge in nutrition*, eds. E.E. Ziegler, LJ Filer Jr. 7a edição, International Life Science Institute Press. 2001, 109-19.
- . Pasquali D, Rossi V, Prezioso D, Gentile V, Colantuoni V, Lotti T, Bellastella A, Sinisi AA. Changes in tissue transglutaminase activity and expression during retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in primary cultures of human epithelial prostate cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999, 84:E1463-69.
- . Pasquali D, Thaller C, Eichele G. Abnormal level of retinoic acid in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996, 81:E2186-91.
- . Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and Cancer. *Alcohol & Alcoholism*. 2004, 39:E155-65.
- . Prins GS & Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. 2008; 76(6): 641-659.
- . Prins GS, Huang L, Birch L, Pu Y. The Role of Estrogens in Normal and Abnormal Development of the Prostate Gland. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2006;1089: 1-13.
- . Rehm J, Taylor B, Room R. Global burden of disease from alcohol, illicit drugs and tobacco. *Drug Alcohol Rev*. 2006, 25:E503-13.
- . Rehm J. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. In: Ezzati M, Murray C, Lopez AD, Rodgers A. (eds) *World Health Organization, Geneva*. 2004:E959-1108.

- . Reichman ME. *et al.* Serum Vitamin A and Subsequent Development of Prostate Cancer in the First National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Cancer Research*. 1990, 50:2311-15.
- . Richter F. *et al.* Immunohistochemical Localization of the Retinoic Acid Receptors in Human Prostate. *Journal of Andrology*. 2002, 23:E830-8.
- . Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrinol-Related cancer*. 2004,11:E225-54.
- . Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*. 2007,7:E599–612.
- . Thompson AD. Alcohol and Nutrition. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*. 1978, 405-428.
- . Van Thiel DH & Lester R. Effects of chronic alcohol abuse on sexual function. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1979, 8:E499-510.
- . Van Thiel DH, Gavalier J, Lester R. Ethanol inhibition of vitamin A metabolism in the testes: possible mechanism for sterility in alcoholics. *Science*. 1974, 186:E941-2.
- . Vezina CM, Allgeier SH, Fritz WA, *et al.* Retinoic Acid Induces Prostatic Bud Formation. *Dev Dyn*. 2008; 237(5):1321-33.
- . Vittoria A, La Mura E, Cocca T, Cecio A. Serotonin, somatostatin and chromagranin A-containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. *J. Anat.* 1990, 171:E69-78.
- . Vykhovanets EV. *et al.* Experimental rodent models of prostatitis: limitations and potential. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2007, 10:E15-29.

- . Wan YJY, Cai Y, Magee TR. Retinoic acid differentially regulates retinoic acid receptor-mediated pathways in the HEP3B cell line. *Exp Cell Res.* 1998, 238:E241-7.
- . Wang XD. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol.* 2005,35:E251-8.
- . Warren KR, Foudin LL. Alcohol-related birth defects- the past, present, and future. *Alcohol Res. Health.* 2001, 25:153-8.
- . World Health Organization. Problems related to alcohol consumption. Second report of WHO Expert Committee, WHO Technical Report Series. 2007, no. 944, Geneva, Switzerland.
- . Zachman RD, Grummer MA. The interaction of ethanol and vitamin A as a potential mechanism for the pathogenesis of fetal alcohol syndrome. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 1998, 22:E1544-56.
- . Zou F. *et al.* Retinoic acid activates human inducible nitric oxide synthase gene through binding of RARa/RXRa heterodimer to a novel retinoic acid response element in the promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007, 355:E494-500.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada **Retinol, ácido retinóico e seus receptores e o índice de proliferação celular e de apoptose no lobo dorsolateral da próstata de ratos adultos UCh (bebedores voluntários de etanol a 10%)**”:

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

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº **116/2009**, Instituição: **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu, SP.**

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

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

Beatriz Ap. Fioruci
Aluna: **Beatriz Aparecida Fioruci**

F. E. Martinez
Orientador: **Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez**

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Carimbo e assinatura

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **116-CEEA**, sobre "Quantificação e efeitos do ácido retinóico sobre o lobo dorsolateral da próstata de ratos adultos UCh (bebedores voluntários de etanol a 10%)", sob a responsabilidade de **FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ E SÉRGIO PEREIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de **03/04/2009**.

Botucatu, 3 de abril de 2009.


Profa. Dra. PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO
Presidente - CEEA