

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO

Histologia, Imunohistoquímica e Ultra-estrutura do Epitélio da Uretra

Pélvica e Peniana nas Linhagens de Ratos Albinos UChA e UChB,

Bebedoras Voluntárias de Etanol

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

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

P655h **Pinheiro, Patricia Fernanda Felipe**
Histologia, imunohistoquímica e ultra-estrutura do epitélio da uretra
pélvica e peniana nas linhagens de ratos albinos UChA e UChB,
bebedoras voluntárias de etanol / Patricia Fernanda Felipe Pinheiro.--
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1. Ratos. 2. Alcoolismo. 3. Morfologia. I. Martinez, Francisco Eduardo.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Campinas, 25 de março de 2004.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez (Orientador)

(Assinatura)

Profa. Dra. Maíra Aparecida Stefanini

(Assinatura)

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

(Assinatura)

Profa. Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo

(Assinatura)

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

(Assinatura)

Prof. Dr. Wílson de Mello Júnior

(Assinatura)

Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni

(Assinatura)

Dedico,

À DEUS

Senhor, fazei de mim um instrumento de vossa paz;

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé;

Onde houver erros, que eu leve a verdade;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, fazei com que eu procure mais consolar,

que ser consolado;

Compreender, que ser compreendido;

Amar, que ser amado;

Pois é dando que se recebe;

É perdoando, que se é perdoado;

E é morrendo que se vive para a vida eterna.

São Francisco de Assis (1182-1226)

À minha família, em especial aos meus queridos pais, Álvaro e Abigail, pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida.

*Não sou forte como pensas.
Ajuda-me!
Não sou tão corajoso como queres.
Ensina-me!
Não sou grande como tu.
Espera-me!
Dá-me a tua fortaleza,
espelhada na mão que me sustenta...
A tua coragem, provada, dia a dia,
na tua luta para que eu viva melhor...
A tua grandeza,
presente na dedicação que existia
à espera da minha chegada,
e que existe na continuação do amor feito mensagem,
até que eu chegue no limiar do exemplo que me dás!
E, cada dia, deixa-me ser o filho forte,
o filho corajoso,
o filho grande,
pelo amor com que prepara as homenagens que mereces!*

Ao meu noivo, Rogério, que soube tão bem compreender os meus momentos de ausência em função desse trabalho.

“Tudo que fizeste ficará sempre no meu coração”.

Agradecimentos

Em especial, ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez, meu Mestre, Incentivador e Eterno Amigo.

*“A verdadeira sabedoria
não pode ser definida,
mas sentida, compreendida
e transmitida
somente por aqueles
que a possuem”.*

(autor desconhecido)

Ao Prof. Dr. Jorge Mardones, idealizador e criador das linhagens UChA E UChB. Muito Obrigada.

Aos componentes da Banca Examinadora Profs. Drs. Maíra Aparecida Stefanini, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, Isabel Cristina Cherici de Camargo, Sebastião Roberto Taboga, Wilson de Mello Júnior e Silvana Martinez Baraldi Artoni pelas sugestões, correções e incentivos.

Ao Prof. Dr. Carlos Padovani pelas sugestões, elaborações das tabelas e análise estatística dos resultados desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Anatomia – IB – UNESP – Botucatu pelo convívio e amizade e condições fornecidas para a realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural - IB – UNICAMP, em especial, a Profa. Dra. Shirlei M. Recco Pimentel, Profa. Dra. Maria Júlia Marques e Sra. Lílíam Alves Senne Panagio pela valiosa contribuição para a realização desse trabalho.

Aos amigos e colegas pós-graduandos do Departamento de Anatomia – IB – UNESP – Botucatu pelo convívio, apoio e amizade.

Ao Sr. Wanderley Thiago da Silva pelo convívio, apoio e cuidado com os animais do biotério.

Ao Sr. Marcos R. Franchi pela amizade e valiosa assistência técnica durante a rotina de imunohistoquímica.

À Profa. Dra. Eunice Oba por disponibilizar seu laboratório para as dosagens hormonais.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica por disponibilizar seus laboratórios para as análises em microscopia eletrônica de transmissão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Enfim, agradeço à todos aqueles que, em qualquer momento, colocaram-se disponíveis, para a realização desse trabalho. Muito Obrigada.

A vida será doce e fácil de ser vivida, se desde o primeiro percalço o homem aprende a ser RESIGNADO. Então ele saberá encontrar REALIZAÇÃO no impossível, ALEGRIA no sofrimento, CONFORTO na derrota e MODÉSTIA na vitória.

José Almodova

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Introdução Geral</i>	3
<i>Células neuroendócrinas (NE) prostáticas e uretrais</i>	3
<i>O alcoolismo</i>	5
<i>Metabolismo oxidativo do etanol - Variações genéticas nas enzimas que metabolizam o etanol</i>	6
<i>Animais experimentais</i>	8
<i>Efeitos do álcool sobre o aparelho urogenital masculino</i>	9
<i>Objetivos</i>	11
<i>Artigos</i>	12
• <i>Histochemistry, Immunohistochemistry and Ultrastructure of the Epithelium and of the Neuroendocrine Cells of the Pelvic Urethra in an Ethanol-Drinking Rat Strain (UChA and UChB)</i>	13
• <i>Histologia e Ultra-estrutura da Uretra Peniana e da Célula Neuroendócrina de Ratos UChA e UChB (Bebedores Voluntários de Etanol)</i>	43
<i>Conclusões Gerais</i>	78
<i>Referências Bibliográficas Gerais</i>	79

O uso excessivo de etanol causa alterações significativas no aparelho stema urogenital, porém trabalhos relacionando o consumo crônico dessa substância à morfologia uretral são inéditos. O presente trabalho tem como objetivo descrever a histologia, a histoquímica, a imunohistoquímica e a ultra-estrutura do epitélio uretral de ratos albinos UChA e UChB de consumo voluntário de etanol a 10%. Foram utilizados 74 ratos machos adultos dos seguintes grupos: (1) UChA de baixo consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol = 5,86g/Kg/dia), (2) UChB de alto consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol = 7,16g/Kg/dia) e (3) Wistar de consumo voluntário de água. Técnicas convencionais de microscopia de luz, de eletrônica de transmissão e morfométricas foram utilizadas. O epitélio da uretra pélvica apresentou três tipos celulares: I, II e neuroendócrino (NE). O tipo I apresentou matriz citoplasmática rica em polirribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso. O tipo II com características similares às descritas para o tipo I, acrescido de complexo de Golgi e ápice celular com microvilos. As células I e II apresentaram gotas de lipídio próximas ao núcleo. As células NE apresentaram-se argirófilas e positivas para serotonina. A uretra peniana apresentou quatro tipos celulares: basal, intermediário, superficial e neuroendócrino. Núcleo e matriz citoplasmática elétrondensos e presença de filamentos citoplasmáticos intermediários caracterizaram a célula basal. A intermediária apresentou matriz citoplasmática clara, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso lamelar. A célula superficial apresentou gotas de lipídio e ápice celular com microvilos curtos. Nas amostras observadas da uretra peniana, não houve marcação positiva na imunohistoquímica com prata e serotonina. Ultra-estruturalmente, a célula NE apresentou matriz citoplasmática rica em grânulos. Na lamina própria do epitélio uretral pélvico e peniano, observou-se fibras nervosas mielínicas e amielínicas. Conclui-se que o consumo crônico de etanol induz alterações morfológicas e fisiológicas no epitélio da uretra de ratos UCh, as células NE uretrais dos ratos controle e UCh são similares, quanto a imunohistoquímica e a ultra-estrutura, aos outros tipos celulares do sistema APUD, a associação estrutural existente entre o epitélio uretral e as fibras nervosas aferentes influencia as células NE e os outros tipos celulares do epitélio uretral através de ação parácrina e os ratos UCh apresentam adaptações à ingestão crônica de etanol.

Palavras-chave: uretra, célula neuroendócrina, ratos UCh, alcoolismo.

The extreme use of ethanol causes significant alterations in the urogenital tract, however papers relating the ethanol chronic consumption to the urethral morphology are unknown. The objective of the present paper was to describe the histology, histochemistry, immunohistochemistry and ultrastructure of the urethral epithelium in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). Seventy-four adult male rats of the following groups were used: (1) UChA rats of low voluntary consumption of ethanol 10% (water + ethanol = 5.86g/Kg/day), (2) UChB rats of high voluntary consumption of ethanol 10% (water + ethanol = 7.16g/Kg/day) and (3) Wistar of voluntary water consumption. Conventional techniques of light, transmission electron microscopy and morphometrics were utilized. The pelvic urethral epithelium presented three cellular types: I, II and neuroendocrine (NE). The type I presented rich cytoplasmic matrix in free ribosomes, rough endoplasmic reticulum and mitochondria. The type II with similar characteristics to the described to the type I, increased of Golgi complex and cellular apex with microvilli. The I and II cells presented lipid drops near to the nucleus. The NE cells presented argyrophil and serotonin-positive. The penile urethra presented four cellular types: basal, intermediate, superficial and NE. The basal cell was characterized by nucleus and cytoplasmic matrix electron dense and presence of intermediate cytoplasmic filaments. The intermediate cell presented clear cytoplasmic matrix, Golgi complex and rough endoplasmic reticulum in concentric whorls. The superficial cell presented lipid drops and cellular apex with short microvilli. In the samples observed of the penile urethra, there isn't positive reaction for histochemistry with silver or for immunohistochemistry with serotonin. Ultrastructurally, NE presented rich cytoplasmic matrix in granules. The propria lamina of the pelvic and penile epithelium, it observed myelinated and nonmyelinated nerve fibers. It concludes that the ethanol chronic consumption induces morphological and physiological alterations in the UCh rats urethral epithelium; the immunohistochemistry and ultrastructure of the control rat urethral NE cells and UChA and UChB groups are similar to the other APUD system cellular types; the structural association between the urethral epithelium and afferent nervous fibers influences the NE cells and the other urethral epithelium cells types through paracrine action and the UCh rats presented adaptations to the ethanol chronic ingestion.

Keywords: urethra, neuroendocrine cell, UCh rats, alcoholism.

Introdução Geral

Células neuroendócrinas (NE) prostáticas e uretrais

As células NE ou endócrinas-parácrinas (EP) da região uretro-prostática foram primeiramente descritas por PRETL em 1944. Trata-se de células epiteliais reguladoras com características neuroendócrinas, consideradas parte do **Sistema Neuroendócrino Difuso (SND) ou APUD (*amine precursors uptake and decarboxylation*)** proposto por FEYTER em 1938.

PEARSE (1969) relatou que as células NE do SND são análogas ao Sistema Paraganglionar, proeminente em fetos, descrito como fonte principal de catecolaminas, enquanto a medula da glândula supra-renal ainda está em desenvolvimento. As células NE sintetizam peptídeos que atuam como hormônios ou neurotransmissores (aminas biogênicas - adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, entre outras). PEARSE (1969) considerou o SND como sendo uma terceira linha que modifica ou amplia as ações dos neurônios nas divisões autônomas. As secreções das células podem agir sobre as células contíguas, sobre grupos adjacentes de células ou sobre grupos de células distantes através do transporte no sangue. O SND, presente nas mucosas do estômago, do intestino delgado e grosso, do sistema respiratório, da tireóide, da hipófise, da próstata e da uretra complementa e coordena os sistemas nervoso e endócrino, interagindo no mecanismo preciso do controle homeostático.

DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN (1984) descreveram a diversidade de células NE na próstata e na uretra prostática humana. As células NE estão presentes em todas as regiões da próstata humana desde o nascimento, não sendo detectada na infância, reaparecendo na puberdade. A relação entre a idade e o número dessas células não está definida no humano (DI SANT'AGNESE & COCKETT, 1994). Entretanto, em cobaias as células NE da próstata aumentam significativamente com o envelhecimento (DI SANT'AGNESE *et al.*, 1987).

A maioria dos relatos sobre as células NE no sistema digestório e no complexo uretro-prostático está baseada na morfologia dos grânulos citoplasmáticos e, principalmente, no tipo de hormônio polipeptídeo ou da amina biogênica relacionada com

esse tipo celular (SOLCIA *et al.*, 1975). Em microscopia eletrônica de transmissão, as células NE contêm vários tipos de grânulos elétron-densos, variando na forma de célula para célula e dentro de uma mesma célula, sugerindo assim, grande variedade de tipos celulares baseados na morfologia dos grânulos neurosecretores. Essas células podem apresentar uma subpopulação, contendo corpos mielóides/lamelares, representando a crinofagia (digestão do excesso de grânulos neurosecretores).

Em estudo sobre as células NE do complexo uretro-prostático do carneiro, VITTORIA *et al.* (1990) determinaram através de métodos imunohistoquímicos dois tipos de aminas biogênicas, a serotonina e a somatostatina. O papel funcional da serotonina dentro do trato urogenital é desconhecido. No sistema respiratório, a serotonina estimula a secreção exócrina do epitélio, particularmente das células mucosas (FURNES & COSTA, 1982). Segundo DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN (1984), a serotonina poderia agir no sistema urogenital influenciando a composição do sêmen, induzindo a contração da musculatura dos órgãos urogenitais, podendo regular o fluxo de urina ou sêmen.

A somatostatina inibi secreções endócrinas e exócrinas do sistema digestório (REICHLIN, 1983a). É geralmente lançada nos espaços intercelulares agindo nas células vizinhas (ação parácrina) (REICHLIN, 1983b). DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN (1984) acreditam que no complexo uretro-prostático do carneiro, a ação da somatostatina seja similar à descrita no sistema digestório.

PINHEIRO *et al.* (2003) relatou a presença de células NE no epitélio da uretra pélvica e peniana do gerbilo da Mongólia. As células apresentaram grânulos citoplasmáticos similares aos descritos nas células NE (ou parácrinas) do epitélio da próstata e da uretra prostática humana (DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN, 1984). Além disso, foram observados microvilos curtos e uniformes no epitélio uretral, semelhante ao observado por RAMSDALE (1974) em estudo sobre células “cromoafins” (NE) uretrais. O autor sugere que os microvilos possam atuar como receptores ou sensores do ambiente da luz uretral, estimulando, dessa forma, a ação das células parácrinas.

Alguns trabalhos relacionam a hiperplasia prostática benigna e o câncer prostático com a diferenciação das células NE (AZZOPARDI & EVANS, 1971; POLLICE *et al.*,

1979, DI SANT'AGNESE, 2001). Segundo os autores, as células NE produzem hormônios ectópicos que influenciam o comportamento de tumores e suas respostas às terapias.

As células NE podem estar envolvidas na regulação do crescimento, na diferenciação e na regulação de processos de secreção envolvidos na maturação prostática. Essa hipótese está baseada em 3 fatores: 1) na morfologia das células NE, 2) na função dos produtos de secreção dos grânulos neurosecretores e 3) na analogia com outros tecidos glandulares ou não que são influenciados pelo SND (DI SANT'AGNESE, 2001).

O alcoolismo

Aspectos gerais

O uso de bebidas alcoólicas é tão antigo quanto a própria Humanidade. Beber moderada e esporadicamente faz parte dos hábitos de diversas sociedades. Determinar o limite entre o beber social, o uso abusivo ou nocivo de álcool e o alcoolismo (síndrome de dependência do álcool) são por vezes difícil, pois esses limites são tênues, variam de pessoa para pessoa e de cultura para cultura. Estima-se que cerca de 10% das mulheres e 20% dos homens façam uso abusivo do álcool; 5% das mulheres e 10% dos homens apresentam a síndrome de dependência do álcool ou alcoolismo. Sabe-se também que o álcool está relacionado com 50% dos casos de morte em acidentes automobilísticos, 50% dos homicídios e 25% dos suicídios. Frequentemente pessoas portadoras de outras doenças mentais (p. ex., ansiedade, pânico, fobias, depressão) apresentam também problemas relacionados ao uso de álcool. (NETO, 2003).

Assim, o alcoolismo, pelas complicações sobrevindas no plano somático e psíquico, e pela profunda repercussão no meio social, figura como um dos mais graves problemas de saúde pública no Brasil (FORTES & CARDO, 1991).

Pesquisas realizadas demonstram que o consumo excessivo de álcool compromete principalmente o sistema nervoso central (CLAIR, 1991), podendo também afetar diversos órgãos, entre eles, trato gastrointestinal e reprodutivo (MINICS *et al.*, 1973; PALMER, 1989; MARTINEZ *et al.*, 1993; NOVELLI, *et al.*, 1997; MARTINEZ *et al.*, 1997, 2000; CAGNON *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2002).

Metabolismo oxidativo do etanol

Variações genéticas nas enzimas que metabolizam o etanol

O álcool depois de absorvido pelo trato gastrointestinal é transportado através da circulação portal ao fígado onde é oxidado. Apenas 2 a 10% da quantidade absorvida é eliminada pelos rins e pulmões (LIEBER, 1993).

No hepatócito há três vias metabólicas com a capacidade de oxidar o etanol em aldeído acético, (1) o sistema da enzima álcool desidrogenase (ADH) na matriz citoplasmática que medeia a conversão de álcool a aldeído acético, (2) o microsomal de oxidação do etanol (MEOS) no retículo endoplasmático liso e o da (3) catalase nos peroxissomos (LIEBER, 1993).

O sistema da ADH é responsável pela eliminação do álcool produzido pela fermentação bacteriana no intestino e é principal via metabólica para a transformação do etanol em aldeído acético. A atividade da ADH parece ser o principal fator limitante da oxidação do álcool etílico (KITSON, 1996). A ADH está principalmente localizada no fígado, porém foi também encontrada nos testículos e estômago. Há várias formas de ADH que são codificadas por oito genes e classificadas em seis classes. As isoenzimas de classe I (ADH1, ADH2 e ADH3), constituídas por associações de subunidades polipeptídicas α , β e γ , respectivamente, têm alta afinidade pelo etanol. As enzimas ADH2 (codificam três subunidades β diferentes) e ADH3 (codificam duas subunidades γ diferentes) apresentaram-se polimórficas. Esses alelos estão distribuídos diferentemente nos grupos raciais: β_1 predomina em brancos e negros, β_2 em japoneses e chineses e β_3 aparece em 25% da população negra. Esse polimorfismo genético da ADH pode influir no hábito de ingerir bebidas alcoólicas e no desenvolvimento da doença hepática. A enzima codificada pelo alelo ADH2*2 ($\beta_2\beta_2$) é mais ativa na oxidação do etanol, gerando mais aldeído acético. Pessoas com esse alelo geralmente não consomem bebidas alcoólicas pela alta frequência de reações adversas. A ADH de classe II (ADH4) que expressa a subunidade π tem atividade menor em baixas concentrações de etanol. A ADH de classe III (ADH5), isoenzima que apresenta a subunidade χ , tem baixa afinidade para o etanol e oxida alcoóis de cadeia longa, funcionando como uma formaldeído desidrogenase. A classe IV (ADH6)

está presente na mucosa do trato gastrointestinal e na córnea, representando uma barreira metabólica contra a entrada de alcoóis e aldeídos externos. As ADH de classe V (ADH7) e VI (ADH8) foram descritas recentemente e ainda não se conhece sua importância no processo de metabolização do etanol (MINCIS, 2001).

O consumo crônico de álcool tanto no homem quanto no rato está associado ao aumento do retículo endoplasmático liso no fígado, possível local de oxidação do etanol (GAYOTTO & ALVES, 2001). LIEBER & DE CARLI (1991) demonstraram a presença do sistema enzimático oxidativo microsomal (MEOS). As enzimas microsomais pertencem à família de proteínas chamadas citocromos, alguns localizados no retículo endoplasmático. O MEOS oxida o álcool a aldeído acético por meio do citocromo P4502E1 ou do CYP2E1, ambos descobertos no retículo endoplasmático do fígado. Foram classificados três genótipos para o CYP2E1: A e C (homozigotos) e B (heterozigoto).

A catalase é capaz de oxidar o etanol *in vitro* na presença de peróxido de hidrogênio, porém sob condições fisiológicas, a enzima não parece ter papel relevante no metabolismo humano (LIEBER, 1993).

Independente da via metabólica o etanol é convertido em aldeído acético e depois em acetato. O acetato é lançado na corrente sangüínea, sendo rapidamente metabolizado nos tecidos extra-hepáticos em dióxido de carbono e água. A enzima aldeído desidrogenase (ALDH) é responsável pela oxidação de aproximadamente 90% do aldeído acético formado pelo metabolismo do etanol. Existem múltiplas formas moleculares da ALDH que estão reunidas em quatro classes: isoenzimas de classe I e II (ALDH1 e ALDH2) e de classe III e IV (ALDH3 e ALDH4). As ALDH1 e ALDH3 estão situadas na matriz citoplasmática, enquanto as ALDH2 e ALDH4 na mitocôndria. O aldeído acético é oxidado principalmente na mitocôndria pela ALDH2, a qual exibe polimorfismo (ALDH2*1 e ALDH2*2). No Japão, regiões adjacentes do leste e sudoeste asiático concentram o alelo ALDH2*2. A frequência diminui gradualmente na direção da Ásia Central e Ocidental e é raramente observado em populações do norte do continente. A ALDH2 mitocondrial ativa é capaz de eliminar todo o aldeído acético produzido pela oxidação do etanol, eliminando-o do organismo. Pessoas homozigotas para o alelo ALDH2*2 não podem metabolizar o aldeído acético (MINCIS, 2001).

Na oxidação do etanol mediada pela ADH e a do aldeído acético mediada pela ALDH, há transferência de íons de hidrogênio do etanol para o co-fator nicotiamida adenina dinucleotídeo (NAD), que é convertido para sua forma reduzida NADH. Nesses processos se têm um excesso de equivalentes reduzidos de NADH na matriz citoplasmática do hepatócito, alterando a homeostase celular. A manifestação mais frequentemente relatada no uso excessivo do álcool é o fígado gorduroso. A lipogênese aumentada pode ser considerada como uma forma das células se desfazer do excesso de íons hidrogênio. A atividade do ciclo do ácido cítrico fica deprimida pelo fato da mitocôndria utilizar os equivalentes de hidrogênio originados no metabolismo do etanol como fonte de energia em detrimento dos derivados do metabolismo dos ácidos graxos. A diminuição da oxidação dos ácidos graxos resulta no acúmulo hepático de lipídio (LIEBER, 1991). Além disso, parece que a oxidação dos ácidos graxos em organismos femininos é menos eficiente do que no masculino por deficiência na ativação desse mecanismo (MAHER, 1997).

Animais experimentais

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

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

LI *et al.* (1987) relataram a existência de três pares de linhagens de ratos de consumo baixo de álcool. Os UChA e UChB (UCh = Universidade do Chile), os de Helsink, iniciados por KALERVO ERIKSSON e os de LUMENG & LI em Indianápolis.

As linhagens AA (*Alko Alcohol*) e ANA (*Alko Nonalcohol*) de Helsinki foram obtidas por cruzamentos alternados *inbreeding* com *outbreeding*. As linhagens P (*Alcohol Preferring-5-8g/kg/day*) e NP (*Non-Alcohol-Preferring - menos de 0,5g/kg/dia*) de LUMENG & LI têm sido obtidas por cruzamentos *outbreeding*. Além dessas linhagens de ratos, existem raças de camundongos, entre as de consumo voluntário mais elevado é a C57BL/6 e entre as de consumo baixo é a BALB e DBA (MCCLEARN & RODGERS, 1961). As variedades UChA e UChB constituem modelos raros para estudos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool, tão bem quanto o apetite e tolerância que são importantes fatores do alcoolismo humano.

Para que a doença do alcoolismo se estabeleça é necessário, além da predisposição, que o paciente tenha bebido álcool em quantidades suficientemente grandes, durante período longo. Os resultados em modelo animal têm demonstrado a presença de mecanismos de apetite e saciedade ao álcool, e está no caminho de se conhecer os neurônios que constituem as respectivas redes. É indiscutível a colaboração em dois caminhos importantes para o enfoque dos estudos sobre alcoolismo humano: 1) busca de marcadores genéticos que indiquem a predisposição ao alcoolismo e 2) busca de uma terapêutica mais eficaz que a que se dispõe hoje para o tratamento do alcoolismo (MARDONES, 1993).

Efeitos do álcool sobre o aparelho urogenital masculino

Numerosos estudos sobre o sistema genital masculino humano e de animais relatam que o álcool prejudica a produção de testosterona e provoca atrofia testicular. Tais alterações podem resultar em impotência, infertilidade e redução das características sexuais secundárias (EMANUELE & EMANUELE, 1998).

O hipogonadismo no homem tem sido associado ao alcoolismo crônico por mais de um século. O baixo peso testicular relativo ao peso do corpo é uma clara indicação da influência tóxica do etanol sobre os testículos (KLASSEN & PERSAUD, 1978). Essa atrofia testicular é causada por vários fatores, incluindo os danos que o álcool causa diretamente nos testículos, por exemplo, nas células de Sertoli e Leydig, alteração na

produção, secreção e atividade dos níveis dos hormônios hipofisários LH e o FSH (EMANUELE & EMANUELE, 1998).

Segundo MARTINEZ *et al.* (2002), os vários estudos sobre as alterações morfológicas na próstata, vesícula seminal, glândula de coagulação, epidídimo e testículo são controversos. Essas alterações são decorrentes dos diferentes protocolos experimentais empregados nos estudos que relacionam alcoolismo com alterações no complexo reprodutor masculino.

Estudos que relacionam o alcoolismo com o aparecimento do câncer na bexiga urinária também são controversos. Segundo JENSEN (1979), o consumo crônico de álcool não configura como um importante fator de risco ao surgimento do câncer de bexiga urinária, porém DRIVER & SWANN (1987) sugerem que exista relação direta entre o alcoolismo crônico e o câncer de bexiga urinária. De acordo com van DIJK *et al.* (2001) o genótipo ADH3 ($\gamma\gamma$) parece possuir um fator de risco aumentado para o câncer de bexiga urinária.

A uretra sofre ação direta e indireta dos produtos do metabolismo da oxidação do etanol. As células NE participam da regulação das funções intraepiteliais na uretra. Dessa forma, o presente trabalho propõe avaliar a morfologia do epitélio da uretra.

Objetivos

Avaliar a histologia, a histoquímica, a imunohistoquímica e a ultra-estrutura do epitélio da uretra pélvica e peniana nas linhagens de ratos albinos UChA e UChB, bebedoras voluntárias de etanol a 10%.

Artigos

Artigo 1: Histochemistry, Immunohistochemistry and Ultrastructure of the Epithelium and of the Neuroendocrine Cells of the Pelvic Urethra in an Ethanol-Drinking Rat Strain (UChA and UChB), submetido ao Journal of Anatomy.

Artigo 2: Histologia e Ultra-estrutura da Uretra Peniana e da Célula Neuroendócrina de Ratos UChA e UChB (Bebedores Voluntários de Etanol).

Histochemistry, Immunohistochemistry and Ultrastructure of the Epithelium and of the Neuroendocrine Cells of the Pelvic Urethra in an Ethanol-Drinking Rat Strain (UChA and UChB)

P. F. F. Pinheiro^{1,2}, T. M. Segatelli³, C. C. D. Almeida^{1,2}, M. Martinez⁴, C. R. Padovani⁵ and F. E. Martinez²

¹*Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;* ²*Department of Anatomy, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil;* ³*UEM, Department of Morphology and Physiology, Maringá -PR, Brazil;* ⁴*Department of Morphology and Pathology, UFSCar, São Carlos, SP, Brazil;* ⁵*Department of Biostatistics, , Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.*

*Correspondence to Patricia Fernanda Felipe Pinheiro - Department of Anatomy, Biosciences Institute, UNESP, Campus of Botucatu – Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu-SP, Brazil, CEP:18618-000, Caixa Postal: 510 - ☎(+5502114) 3811-6040 - FAX (+5502114) 3811-6361
e-mail: pinheiro_patricia@hotmail.com*

Abstract

The epithelium and the NE cells of the pelvic urethra of UChA and UChB rats selected genetically was evaluated. Conventional techniques of histology, histochemistry, immunohistochemistry and ultrastructural were used in thirty adult male rats (UChA, UChB and Wistar). The epithelium of the pelvic urethra presented three cellular types: I, II and NE cells. The type I cells with a rich cytoplasmic matrix in free ribosomes, rough endoplasmic reticulum; type II cells with similar features described for the type I cells, in addition to a Golgi complex, cellular apex with short microvilli. Type I and II cells of the UChA and UChB groups presented lipid drops next to the nucleus. The NE cells argyrophil-positive and serotonin-positive were observed. Ultrastructurally, the NE presented cytoplasmic matrix with granules. Autonomous innervation, close to the NE cells, was observed in the propria lamina of the urethral epithelium. The chronic consumption of ethanol induces morphological alterations in the epithelial cells of the urethra. The NE cells of the urethra did not suffer significant alterations under effect of the

10% ethanol. There is structural association among the NE cells and the nervous fibers in the urethra of Wistar, UChA and UChB rats.

Short title: Morphological study of the urethra in an ethanol-drinking rat strain

Keywords: neuroendocrine cell, urethra, rats UCh, alcoholism

Introduction

The pelvic urethral epithelium is stratified and composed of cubic and cylindrical cells. The epithelium is regulated through nervous fibers and neuroendocrine (NE) or endocrine-paracrine (EP) cells.

In the epithelium of many organs, the NE cells or paraneurons produce different bioactive substances, usually of aminic, nucleotidic or peptidic nature (Fujita, 1980). The secretory vesicles of the NE cells can contain chromogranins A, B and C, being the chromogranin A the most frequent type. According to Deftos (1991), the chromogranins are considered marker proteins of the paraneurons.

The presence of NE cells in the urogenital tract of domestic animals of both sexes has been studied through argyrophil and argentaffin techniques (Vittoria *et al.*, 1990). The NE cells have also been studied in the human urethra (Lendon *et al.*, 1976). Different subpopulations of NE cells of organs of the human urogenital tract and of different species have also been demonstrated by immunohistochemical, immunofluorescent and ultrastructural methods (Lendon *et al.*, 1976; Di Sant'Agnese & Mesy Jensen, 1984; Vittoria *et al.*, 1990). Based on those methods, 5-HT (serotonin), somatostatin, chromogranin were verified in the human urogenital tract and of sheep. The use of such techniques in studies of NE cells in the urogenital tract of domestic animals and laboratory rodents are less numerous (Dixon, *et al.*, 1973; Pinheiro *et al.*, 2003).

Until today among mammals, including man and the rodents used in the laboratory, papers about the morphology of the urethra relationship with chronic ethanol ingestion has not been seen. Investigators have shown that the excessive consumption of alcohol results in different morphophysiological alterations of the reproductive system in both humans and laboratory animals leading to different pathologies (Martinez *et al.*, 2000). Different studies using laboratory animals have revealed that there may be a relationship between alcohol preference and both the ability to develop acute tolerance and initial sensitivity to ethanol effects (Tampier *et al.*, 2000). Li *et al.* (1987) related the existence of three pairs of rat strains of low alcohol consumption: UChA and UChB rats at University of Chile, rats from Helsinki initiated by Kalervo Eriksson and the rats of Lumeng & Li at Indianapolis. The AA and ANA strains from Helsinki were obtained by inbreeding alternated crossings with

outbreeding. The P and NP strains of Lumeng & Li have been obtained by outbreeding crossings. Besides those strains of rats, there are breeds of mice; among those of high voluntary consumption, there is the C57 BL; and among those of low voluntary consumption there are the BALB and DBA (Mc Clearn & Rodgers, 1961). The UChA and UChB strains constitute rare models for studying the relationship among the genetic, biochemical, physiologic, nutritional and pharmacological factors from the effects of alcohol, with appetite and tolerance, which are important factors in human alcoholism.

The purpose of this paper was to describe the histochemical, immunohistochemical and ultrastructural features of the epithelium and the NE cells in the pelvic urethra of UCh rats, voluntary drinkers of ethanol, and to contribute to the studies on the effect of chronic alcoholism on the urogenital tract.

Materials and Methods

Animals

Thirty adult male rats (*Rattus norvegicus albinus*) of the UChA, UChB and Wistar (control) strains aged three months were used. Rats were maintained under controlled temperature (23°C) and lighting conditions (12L, 12D photoperiod, lights-out 07:00h). The animals were divided into three groups: 1) UChA rats with voluntary intake of 10% ethanol (5.86g/Kg/day), 2) UChB rats with voluntary intake of 10% ethanol (7.16 g/Kg/day) and 3) Wistar rats with voluntary *ad libitum* water intake. All animals received Nuvital® pellets *ad libitum*. The experimental protocol followed the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Light Microscopy (LM)

The animals were anesthetized with ether and perfused with Bouin solution or with Formaldehyde 10% through left ventricle of the heart. After the pelvic urethra was isolated, collected and fixed in Bouin solution or formaldehyde 10% for 24 hours, they were washed in a solution of 70% alcohol or water, dehydrated in a graded ethanol series, embedded in paraplast and cut into 4µm-thick sections and stained by means of histological, histochemical and immunohistochemical techniques. The histological study included hematoxylin-eosin (HE) and Masson's thricrome (MaT) stains, while the histochemical study included periodic-acid-Schiff (PAS) and argyrophil reactions (Grimelius, 1968)

Method of Grimelius (1986)

The slides were deparaffinized in xylene, and rehydrated through alcohol and rinsed in water. The sections remained in silver solution at 65°C for 3 hours, and then the slides were rinsed in distilled water and placed in Grimelius reducing solution at 65°C for 1 minute. Thereafter, the slides were submitted again to silver solution at 65°C for 1 minute, after which the slides were rinsed in distilled water and again submitted to Grimelius reducing solution at 65°C for 1 minute. Positive controls were used (Fig. 2A-B). The slides were rinsed in distilled water, counterstained with light green, dehydrated through alcohols,

submitted to xylene and mounted. The sections were photographed in a Zeiss Axiophot 2 light microscope.

Immunohistochemistry

Sections of the urethra were stained immunohistochemically using the avidin-biotin-peroxidase complex method. Sections were incubated with the primary antibody mouse monoclonal anti-serotonin (Serotonin, 5HT-H209, MxH, 1:100, DAKO CYT®, Copenhagen, Denmark). The slides were deparaffinized in xylene, rehydrated through alcohol and rinsed in phosphate buffered saline (PBS). Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation for 5 minutes with 3% hydrogen peroxide (3ml hydrogen peroxide: 97ml PBS). Subsequently, the slides were transferred to citrate buffer (0.01M, pH 6.0) in a microwave oven for 15 minutes. After the cooling, the slides were incubated with primary antibody overnight at 4°C. After that, the slides were rinsed with PBS and incubated with biotinylated anti-mouse IgG (biotinylated anti-mouse IgG (H+L) made in horse, 1:160, Vector Laboratories®, Burlingame, USA) for 1 hour and rinsed with PBS and and incubated with avidin-biotin complex for 45 minutes (Vector Elite ABC Kit, Vector Laboratories®, Burlingame, USA). The slides were rinsed with PBS and then the site of antigen-antibody reaction was revealed by diaminobenzidine (DAB). Finally, the slides were counterstained with hematoxylin, mounted and observed. Both negative and positive controls were used (Fig. 2C). The sections were photographed in a Zeiss Axiophot 2 light microscope.

Transmission electron microscopy (TEM)

The animals were anesthetized with ether and perfused with Karnovsky solution through left ventricle of the heart. Fragments of the pelvic urethra, of about 0.5 mm, were fixed in Karnovsky solution (pH 7.2) for three hours. Next, the fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for two hours in darkness. Subsequently, the fragments were dehydrated in acetone series, embedded and included in Epon. Ultrathin sections were obtained with the LBK BROMA 8800 ULTRATOME using glass knives, collected and contrasted with uranyl acetate and lead citrate (Watson, 1958;

Reynolds, 1963). The sections were observed and micrographs obtained from the Phillips CM 301 electron microscope.

Results

Light Microscopy (LM)

The Wistar and UCh rats urethral mucous presented longitudinal folds with transitional epithelium and rich propria lamina in elastic, collagenous and smooth muscle fibers, glands and urethral ducts and blood vessels. The urethral epithelium presented from two to three cellular layers consisting of basal, intermediate, superficial and NE cells. The basal, intermediate, superficial cells presented cubical, spherical and fusiform forms. The big nuclei were observed to be round and fusiform (Fig. 1A-C). Intermediate and superficial cells with bulkier cytoplasm (not quantified) in relation to the same cellular types in the Wistar rats (control group) were observed in the epithelium of the pelvic urethra of UChA and UChB rats (Fig. 1D-E). In the intermediate and superficial cells was observed a distinctive halo around (not quantified) of the nuclei (Fig. 1A-B/D/F). The PAS-staining produced strong intensity in the urethral epithelium of the control rats in the apical cellular region, evidencing the glycocalyx (Fig.1C). Moderated and weak intensity staining (Fig. 1D-E) was observed in the apical region of the epithelia of the UChB and UChA rats respectively.

Neuroendocrine (NE) cells

The argyrophil method of Grimelius and immunohistochemistry revealed NE cells in the urethral epithelium of the Wistar, UChA and UChB strains. The NE cells located in the basal and intermediate layers of the urethral epithelium (Fig. 2A-M). It observed homogenous distribution of argyrophil and serotonin-immunopositive granules accumulated for all the cytoplasm. Morphologically, the NE cells presented small fusiform, triangular, spherical and oval cellular types with cytoplasmic projections similar to dendrites, reaching some times the luminal surface. It was also observed that serotonin-positive and argyrophil-positive NE cells in the prostatic ducts and urethral glands of the Wistar, UChA and UChB groups (Fig. 2 D-S).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The epithelium of the pelvic urethra of the Wistar, UChA and UChB strains rats presented two to three cellular layers. The cells differed with regard to size, content and coloration of the cytoplasmic matrix. The propria lamina presented collagenous fibers in different orientations, fibroblasts and blood vessels. Mast cells next to the type I cells were observed in the underlying conjunctive tissue of the urethra in the UChA and UChB strains. Three different cellular types were shown to be characteristic:

Type I cell (Fig. 3A-B, 4A, C, 5A-C)

In general the type I cells of the Wistar, UChA and UChB strains presented similar features. The contact zone between those cells and the basal lamina was established in intervals through hemidesmosomes. The type I cells presented a rich cytoplasmic matrix in free ribosomes, rough endoplasmic reticulum, spherical mitochondria and cytoplasmic filaments. The nucleus presented a paving-stone appearance with indentations. The nuclear envelope presented a dense band of heterochromatin and distinctive pores. The cells remained connected through desmosomes and cytoplasmic interdigitates.

Type II cell (Fig. 3A-C, 4A, C-D, 5A-C)

The type II cells presented a rich cytoplasmic matrix in free ribosomes, a rough endoplasmic reticulum and Golgi complex. Spherical mitochondria were easily identified in the cytoplasmic matrix. Mitochondria and pinocytose vesicles were frequently observed in the apical cellular portion next to the microvilli. The cellular apex exhibited short microvilli. Similarly to the type I cell, intercellular spaces, desmosomes and cytoplasmic interdigitates were observed. Lipid drops were noticed in the cytoplasmic matrix of the UChA and UChB strains. Apparently, the urethral cells of the UChB strain presented a larger number of lipid drops. The nucleus presented an irregular form.

Neuroendocrine (NE) cell (Fig. 3D, 4A-B, 5D)

The NE cells of the Wistar group presented a rich cytoplasmic matrix in free ribosomes, a rough endoplasmic reticulum, mitochondria and filaments. Empty vesicles or

others containing granules of similar appearance to those cells that secrete polypeptide hormones were observed. The spherical vesicles exhibited central and eccentric granules. Cytoplasmic projections between the type I and II cells were observed. The nucleus with indentations presented a regular band of heterochromatin.

The NE cells of the UChA and UChB strains presented vesicles with granules. The cytoplasmic matrix presented the same elements compared to the control group, although the number of free ribosomes appeared to be reduced. Frequently, myelinated and nonmyelinated nerve fibers were observed in the propria lamina next to basal and NE cells of the three strains.

Figure 1. (A) Pelvic urethra of the Wistar rats. Nucleus (arrows), propria lamina (star), lumen (L) and urethral gland duct (D). HE stain. X1100; (B) Pelvic urethra of the UChA rats. Longitudinal fold of the urethral mucous, nucleus with halo (arrow) and lumen (L). HE stain. X2400. (C) Urethral epithelium of the Wistar rats. Strong positive reaction PAS in the apical region (arrow), basal (B), intermediate (I) and superficial cells (S) and lumen (L). X1400. (D) Moderate positive reaction PAS in the apical region of urethral epithelium of UChB rats (arrow), nucleus with halo (arrowhead), propria lamina (star) and lumen (L). X1600. (E) Weak positive reaction PAS in the apical region of urethral epithelium of UChA rats. Nucleus (arrows), propria lamina (star) and lumen (L). X2000. (F) Urethral epithelium of the Wistar rats. Lumen (L), nucleus (arrow), collagenous fibers (green), gland (G) and urethral duct (D). MaT stain. X2000.

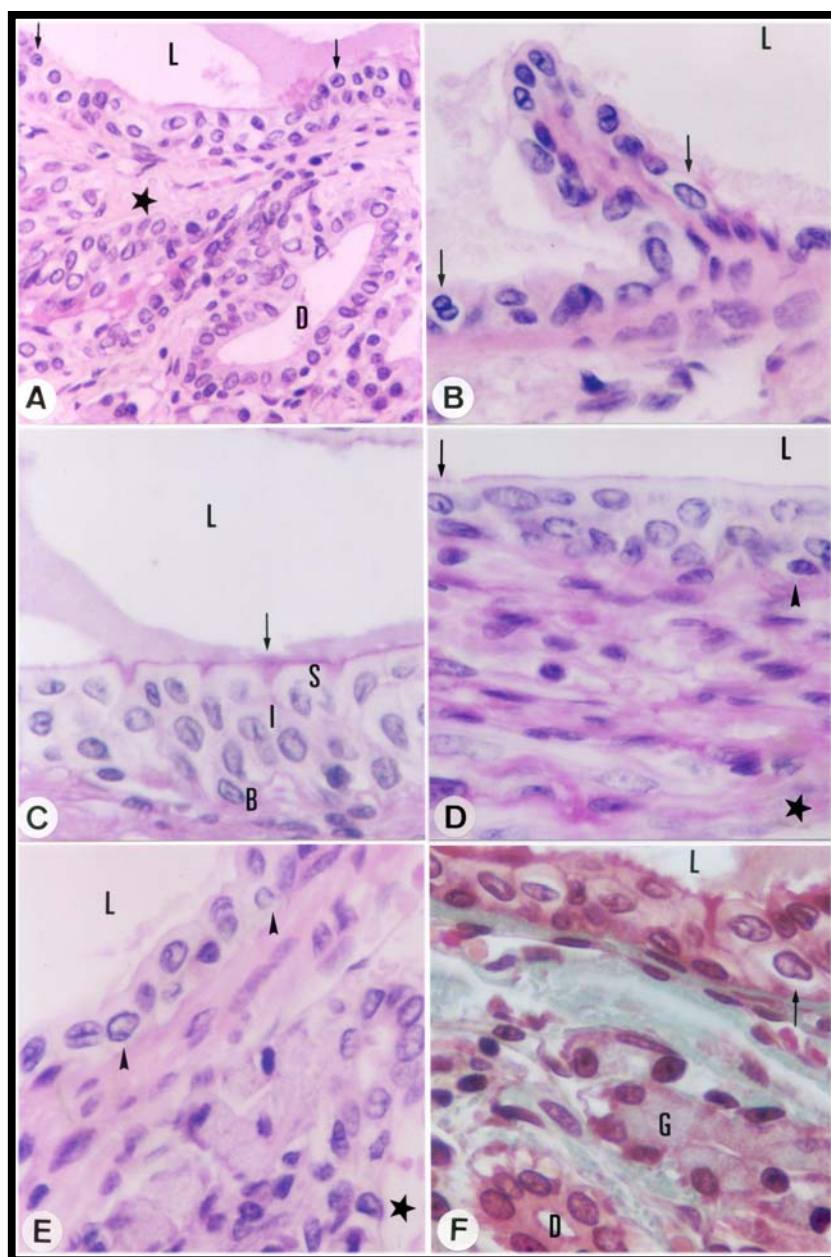


Figure 2. NE cells in the pelvic urethra epithelium. (A) X2000 and (B) X4333, positive control (intestine) argyrophil method. (C) Positive control (intestine) immunohistochemistry method. X2000. (D) Pelvic urethra of the Wistar rats. X1600. Insert: detail of serotonin-positive NE cells in the prostatic duct. X1600, (E) X1800. (F) Pelvic urethra of the UChA rats. 3000X, (G) X4000. (H) Pelvic urethra of the UChB rats X4000, (I) X4000, (J), X3500. Note a long and narrow cytoplasmic process in (H) and (J). (K) Pelvic urethra of the Wistar rats. X3300. (L) Pelvic urethra of the UChA rats. X3666. Insert: detail of argyrophil-positive cells in the urethral gland. X4200. (M) UChB pelvic urethra. X4000. NE cells different shapes. (N) Wistar pelvic urethra. X4666. (O) UChA pelvic urethra. X4666 and (P) X4000. (Q) UChB pelvic urethra. X4500. (R) UChA pelvic urethra and (S). X3666. A-B/ K-Q argyrophil stained NE cells and C-J/R-S serotonin antiserum immunostained NE cells.

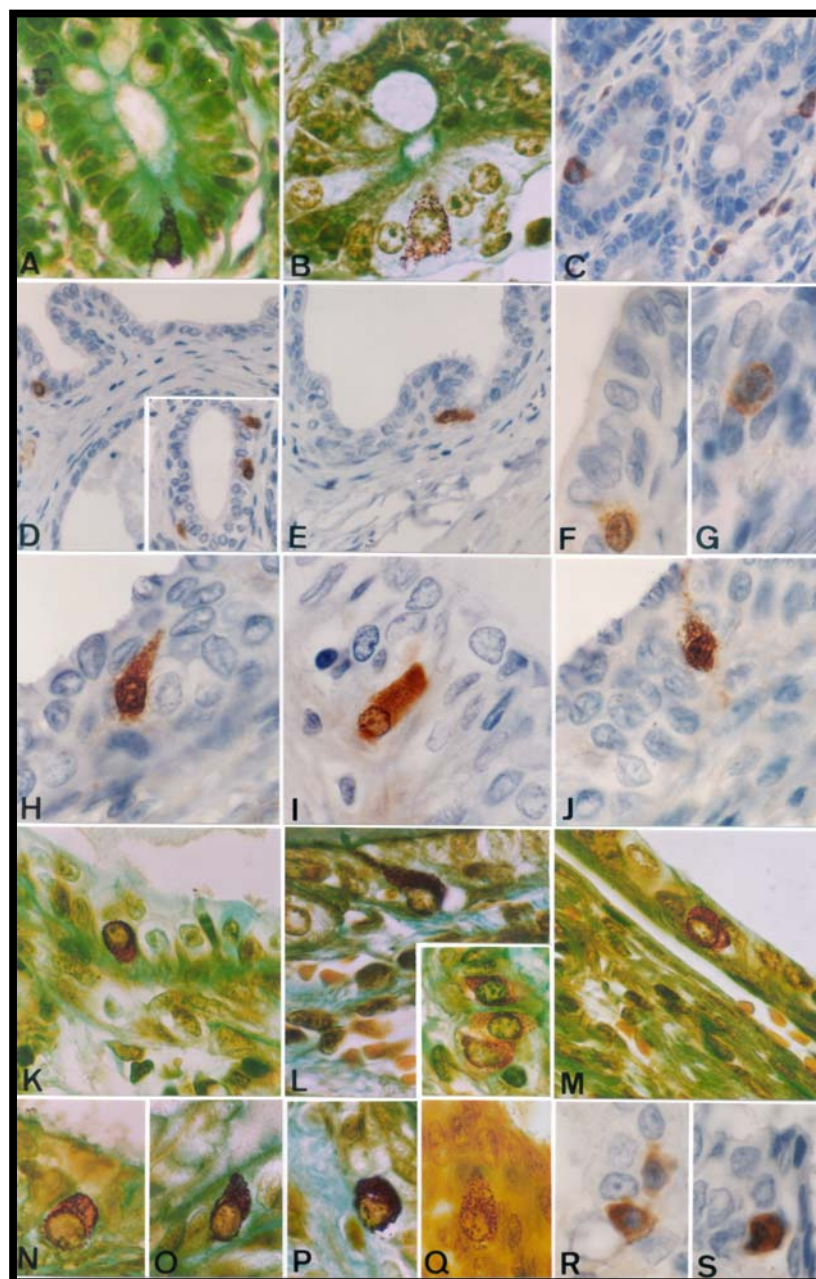


Figure 3. TEM images from the Wistar group rats pelvic urethra epithelium. (A) Type I (I) and II (II) cells. Note the nuclei with indentations (N), microvilli (arrowhead), propria lamina (PL), collagenous fibrils (star) and lumen (L). X4350. (B) Type I (I) and II (II) cells, nucleus (N), basal lamina with hemidesmosomes (arrowhead), fibroblast (F), collagenous fibrils (star), cytoplasmic filament (white arrow), intercellular spaces (IS) and cytoplasmic projections (asterisk). X13250. (C) Type I (I) and II (II) cells. Infolding of the basal lamina (arrow), nucleus (N), rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria (M), desmosomes (arrowhead) and microvilli (wide arrow). X13250. (D) Neuroendocrine cell. Nucleus (N), vesicles with granules (arrowhead) and cytoplasmic filament (arrow). X23000. Insert: detail of the vesicles with granules of size and varied densities electron. X775000.

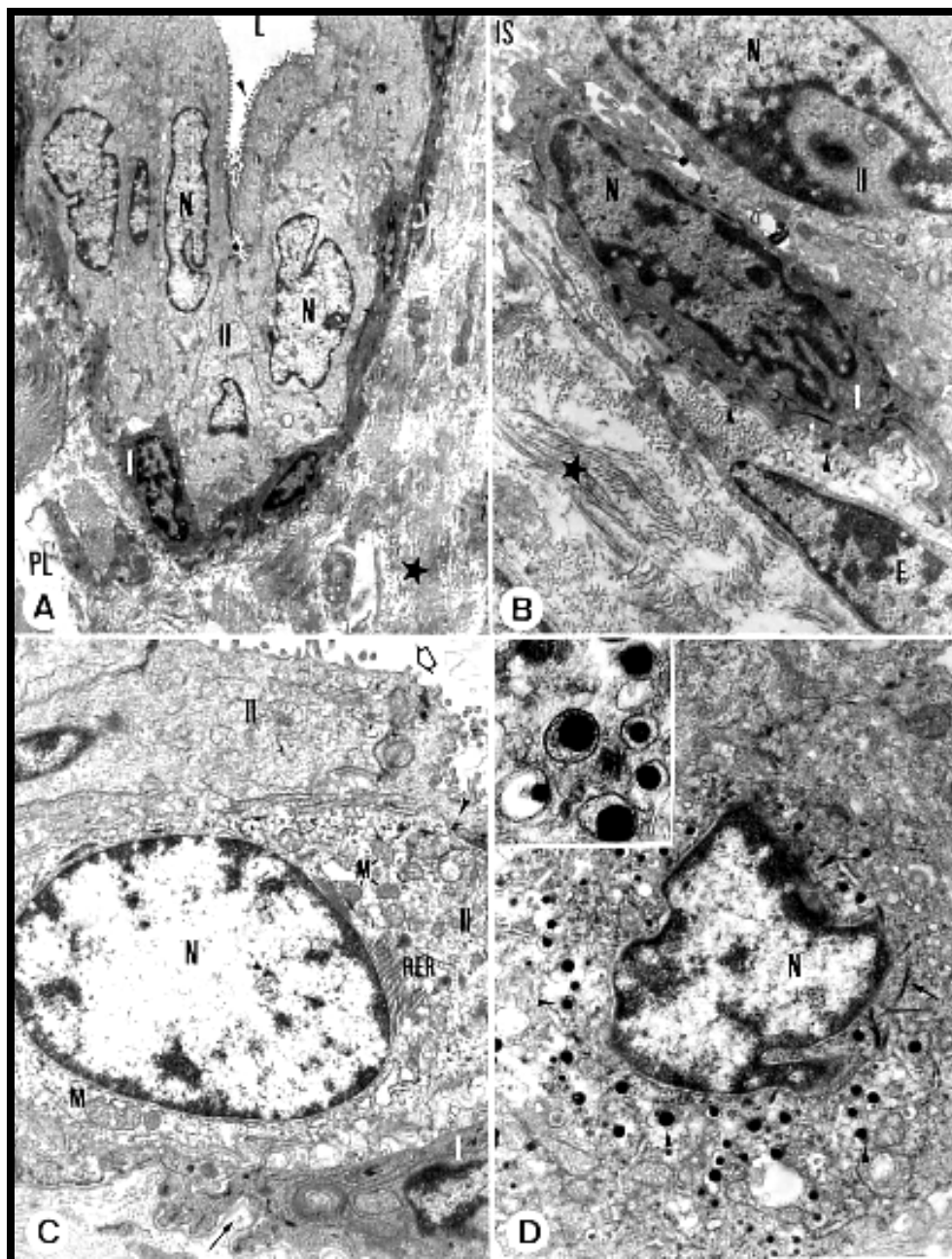


Figure 4. TEM images from the UChA rats pelvic urethra epithelium. (A) Type I (I) and II (II) cells. Nucleus (N), infolding of the propria lamina (PL) en route to the type I cells (arrowhead), collagenous fibrils (star), myelinated nerve fibers (MF), Schwann cell (S), lumen (L) and NE cell (asterisk). X3250. (B) Neuroendocrine cell. Nucleus (N) and vesicles with granules (arrowhead). X9750. Insert: detail of the vesicles with granules of size and varied densities electron. X15750. (C) Type I (I) and II (II) cells. Nucleus with indentations (N), cytoplasmic interdigitations (arrow), microvilli (arrowhead) and lumen (L). X7750. (D) Type II cell. Desmosome (arrowhead), mitochondria (M), microfilaments (arrow), Golgi complex (G), rough endoplasmic reticulum (RER) and lumen (L). X8400.

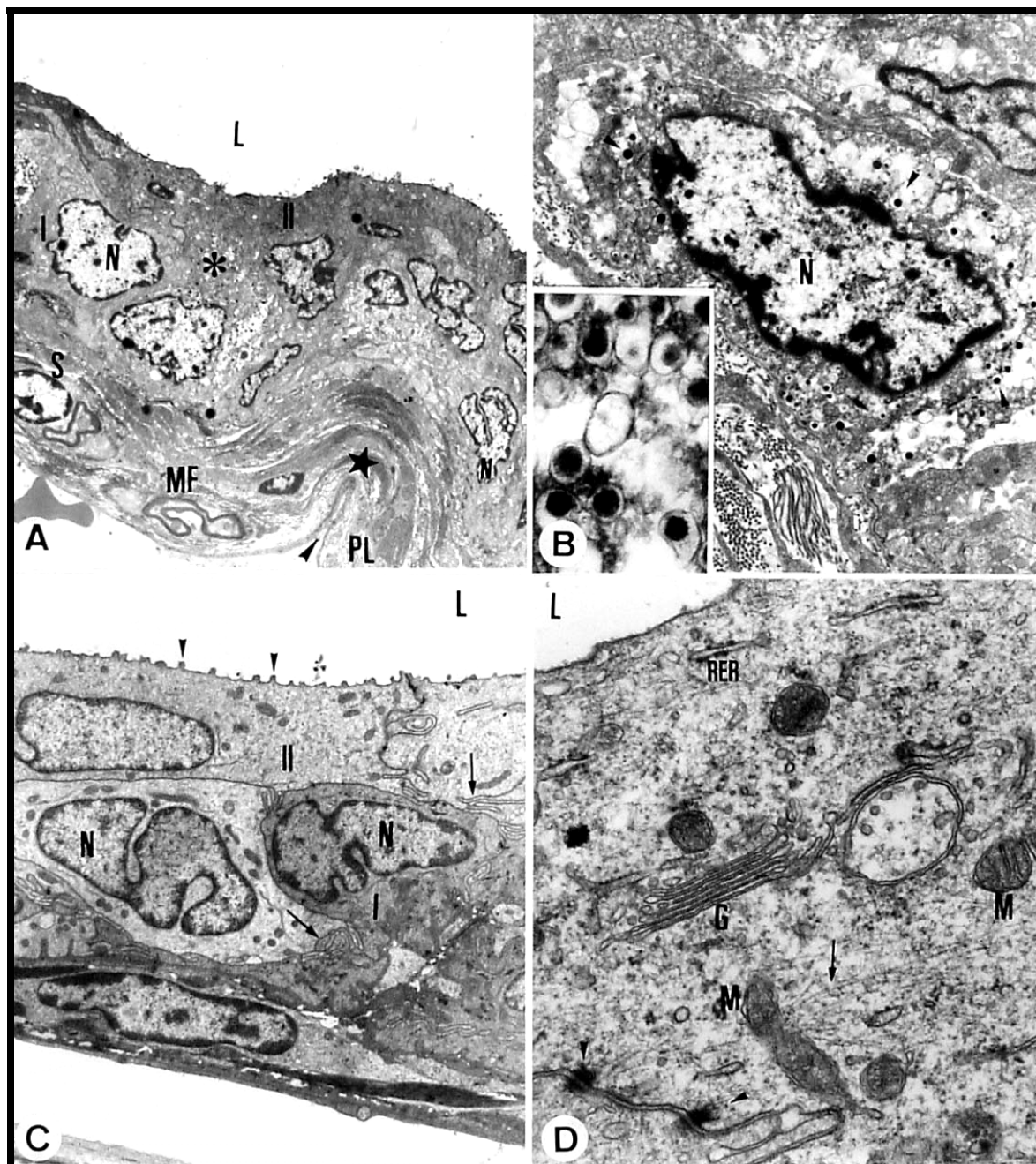
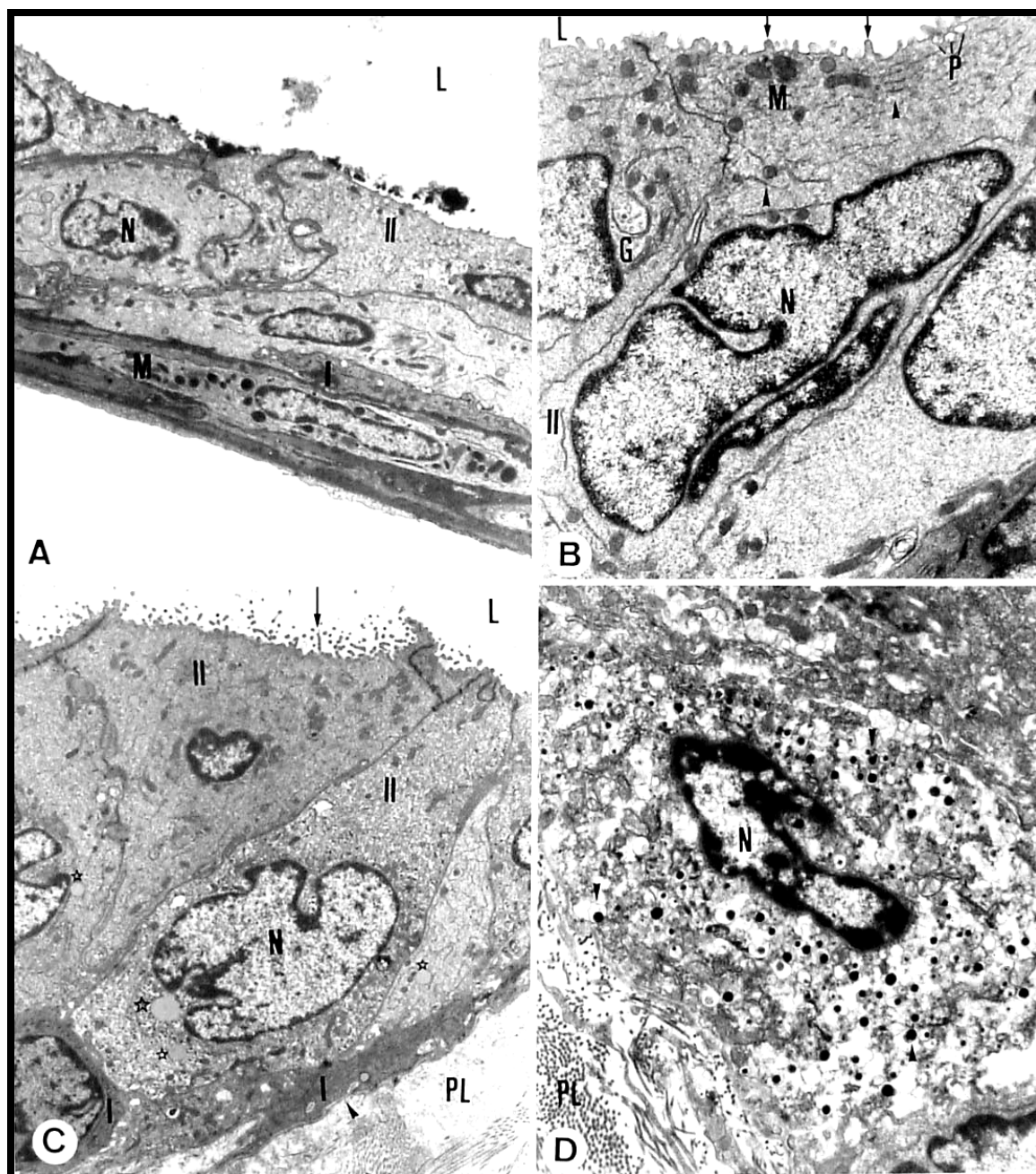


Figure 5. TEM images from the UChB rats pelvic urethra epithelium. (A) Type I (I) and II (II) cells. Nucleus (N), mast cell (M) and lumen (L). X5750. (B) Type II (II) cells. Nucleus with indentations, rough endoplasmic reticulum (arrowhead), mitochondria (M), pinocytose vesicles (P), microvilli (arrow) and lumen (L). X13250. (C) Type I (I) and II (II) cells. Nucleus (N), lipid drops (star), basal lamina (arrowhead), propria lamina (PL), microvilli (arrow) and lumen (L). X5750. (D) Neuroendocrine cell. Nucleus (N), vesicles with granules (arrowhead) and propria lamina (PL). X13250.



Discussion

According to light and ultrastructural microscopy findings, the epithelium of the pelvic urethra of the UChA and UChB strains rats revealed discrete alterations compared to controls. In the epithelium, it observed two to three cellular layers consisting of basal, intermediate, superficial and NE cells that are part of the diffuse neuroendocrine system or APUD (amine precursor uptake and decarboxylation) system. A distinctive halo around of the nucleus of the intermediate and superficial cells of the alcoholic groups was observed. PAS-staining demonstrated discrete reactivity in the glicocalix among control and alcoholic groups. In the bladder urothelium the PAS-staining reactivity is much strong (Alm & Collen, 1982). These features may represent biochemical features of the urethral epithelium of the alcoholic groups.

Although urethra possess in some segments of the epithelium similar features to the urinary bladder, it can observed differences between these organs. Wistar, UChA and UChB strain rats only possess short and uniform microvilli in the apical surface while the urinary bladder shows in the apical surface fusiform vesicles (Verlander, 1998). According to Verlander (1998), the fusiform vesicles function as sources of additional membrane inserted into apical plasma membrane of superficial cells of the urinary bladder in response to its filling. The intercellular spaces in the urethral epithelium are larger than the ones in the urinary bladder. Interdigitations and desmosomes found in the cells of the pelvic urethra, according to Verlander (1998), promote stability and elasticity to the epithelium, which suffers frequent alterations due to the changes from the lumen .

The presence of lipid drops in the cytoplasmic matrix of the urethral epithelium of the UChA and UChB strain rats characterized the most evident morphological alteration front to the consumption of ethanol with relationship to the results observed in the control. In a study on Sertoli cells and epididymis of UChA and UChB rat strain, Martinez *et al.* (2000) observed the presence of lipid drops and dense bodies in the cytoplasmic matrix of the Sertoli cells and in the epididymis epithelium. This accumulation of lipid drops in the urethral epithelium may reflect the attempt of the cell to keep its balance.

In alcohol dehydrogenase (ADH)-mediated oxidation of ethanol, acetaldehyde is produced and hydrogen is transferred from the ethanol to the cofactor nicotianamide adenine dinucleotide (NAD), which is converted to its reduced form (NADH). The acetaldehyde produced again loses hydrogen and is converted to acetate, most of which is released into blood stream. As a net result, ethanol oxidation generates an excess of reducing equivalents in the liver, primarily as NADH, changing the cellular homeostasis. The manifestation more frequently told in the extreme use of the alcohol is the greasy liver. The increased lipogenesis can be considered a means for disposing of the excess of hydrogen. Some hydrogens equivalents are transferred into mitochondria by various “shuttle” mechanisms. The activity of the citric acid cycle is depressed, partly because of a slowing of reactions of the cycle that require NAD; the mitochondria will use the hydrogen equivalents originating from ethanol, rather than those derived from the oxidation of fatty acids that normally serve as the main energy source of the liver. (Lieber, 1991). The activation this alternate pathways of fatty acid metabolism can prevent damage. In rats, however, such activation is less efficient in females than in males, a finding that supports the role of fatty acid toxicity in alcoholic liver damage in women. (Maher, 1997).

Many researchers have noticed the presence of NE cells in the urogenital tract of mammals. The cells NE of the pelvic urethra of UChA and UChB rats resemble those of the gastro-intestinal (digestive) system described by Pearse (1969). The NE cells are part of the diffuse neuroendocrine system, analogous to the paraganglion system, prominent in fetuses as the main source of catecholamines while the adrenal medulla is still developing. The NE cells produce peptides, which act as hormones, neurotransmitters or biogenic amine, usually serotonin. Pearse considered the diffuse neuroendocrine system to be a third division of the nervous system, third-line effectors that support, modify or amplify the actions of the nervous system. The secretions of the cells of the diffuse neuroendocrine system can act on contiguous cells, adjacent groups of cells or groups of distant cells by transport in blood. The diffuse neuroendocrine system of the mucous of the stomach, the small and large intestines, the respiratory system, the thyroid, pituitary and the prostate complement and co-ordinate the nervous and endocrine systems, interacting in the control mechanism necessary for homeostasis (Pearse, 1969).

Through argentaffin histochemistry technique, it was possible to evidence the NE cells in the epithelium of the pelvic urethra of Wistar, UChA and UChB rats. Argentaffin (AN) and argyrophil (AL) cells are usually present in the gastro-intestinal tract (Lillie & Glenner, 1960) as well as the human urinary bladder and prostate (Feyter, 1951; Azzopardi & Evans, 1971). Argentaffin cells are also found in a small amount of prostatic carcinomas (Azzopardi & Evans, 1971).

The difference between the AL and AN cells is that the first needs form an exogenous reducing agent during the silver impregnation, while the second are capable of reducing silver by themselves without exogenous reagent (Lillie & Glenner, 1960). Consequently, the argentaffin-positive cells are also argyrophil-positive and the argyrophil-negative cells are argentaffin-negative. They are considered as belonging to the same metabolic cycle at different functional stages (Kazzaz, 1974).

Feyter (1951) demonstrated the presence of argyrophil cells in the prostate and the human urethra. Argentaffin cells of normal and hyperplasic prostates were demonstrated by Azzopardi & Evans (1971). Studies have related the occurrence of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia to a decrease in the number of NE cells (Azzopardi & Evans, 1971). According to the authors, the NE cells produce hormones influencing the behavior of tumors and responses to therapies.

Di Sant'Agnese & De Mesy Jensen (1984) discovered that the prostate and the human prostatic urethra exhibit great diversity of NE cells. Using histochemical fluorescent methods to detect the presence of amines, some researchers demonstrated in the urethral epithelium of mammals the existence of great number of fluorescent cells serotonin-positive (Lendon *et al.*, 1976; Dixon *et al.*, 1973; Hakanson *et al.*, 1974). The presence of serotonin has been confirmed by immunohistochemical methods in many of those cells. The NE cells of the prostate and the urethra contain serotonin as the main secretory substance, being responsible for the argentaffin-positive reaction and the positive reaction of fluorescence induced by formaldehyde - FIF (Hakanson *et al.*, 1974).

In a study on cells of the urethro-prostatic complex in sheep, Vittoria *et al.* (1990) determined through immunocytochemical methods two types of biogenic amines, serotonin and somatostatin. The functional role of serotonin inside the urogenital tract is unknown. In

the respiratory system, serotonin stimulates exocrine secretion of the epithelium, particularly of the mucous cells (Furnes & Costa, 1982). According to Di Sant'Agnese & De Mesy Jensen (1984), the serotonin-induced contraction in the smooth muscle could regulate the emission of urine or semen.

Somatostatin inhibits endocrine and exocrine secretions of the digestive system (Reichlin, 1983a). Generally it is released from cytoplasmic dendrite-like processes into intercellular spaces, acting on the neighboring cells (paracrine secretion) (Reichlin, 1983a). Di Sant'Agnese & De Mesy (1984) believe that in the sheep urethro-prostatic complex, the action of somatostatin is similar to that described for the digestive system.

Ultrastructurally, the NE cells contain numerous electron-dense granules in the cytoplasm similar to the granules of the enterochromaffin cells (Hankanson *et al.*, 1974; Pinheiro *et al.*, 2003). In an ultrastructural study, Di Sant'Agnese & De Mesy Jensen (1989) related the presence of distinctive myelinoid bodies (myelinosomes) in apparently normal NE cells of the prostate and human urethra. These ultrastructural findings suggest that this phenomenon represents a form of autophagocytosis of the NE cells (crinophagy). In the pelvic urethra of the Wistar, UChA and UChB rats, the NE cells presented cytoplasmic granules similar to those described in the neuroendocrine cells (paracrine) of the prostatic epithelium and of the prostatic urethra (Di Sant'Agnese & De Mesy Jensen, 1984). The ultrastructural similarity of the cytoplasmic granules of the NE cells allows the assumption that such cells present the same peptidic nature.

Ramsdale (1974) in a study on urethra "chromoaffin" cells observed short and uniform microvilli similar to the urethral epithelium of the rats studied in the present paper. He suggests that the microvilli can act as receptors or environmental sensors of the urethral lumen, stimulating in this manner the action of the paracrine cells. According to Di Sant'Agnese (2000), paracrine secretions may influence adjacent stromal cells (stromal-epithelial interactions). In addition to regulating each other, it is likely that the open type cell, which has long specialized microvilli on the intraluminal apical process found by electron microscope, is regulated by a receptorsensory mechanism. This mechanism could inform the luminal contents and send signals back to regulate adjacent epithelial cells and

monitor pH, secretory proteins, mucins, and so on (Di Sant'Agnese & De Mesy Jensen , 1984).

Cytoplasmic processes among the type I, II and NE cells of the urethral epithelium of Wistar, UChA and UChB rats were observed. Probably, the presence of cytoplasmic processes among the epithelial cells, observed in the rat as much as in man, can contribute in the propagation of the effects of the granules of the paracrine cells.

The NE cells can regulate each other. The long dendritic processes suggest a paracrine regulation of adjacent epithelial cells; and evidence demonstrating that these neuroendocrine cell processes often interact with each other, along with the presence of a calcitonin receptor on subsets of neuroendocrine cells, including calcitonin-secreting cells, suggests both paracrine and autocrine regulation of neuroendocrine cells by other neuroendocrine cells (Di Sant'Agnese, 1998). Furthermore, relatively high levels of several peptides found in the seminal fluid suggest the possibility of lumenocrine secretion and regulation of cells lining the male genital tract and, possibly, the female genital tract (Sasaki & Yoshinaga, 1989). Afferent neuroprocesses seen in association with prostatic neuroendocrine cells suggest there may also be a neurocrine regulation whereby neuroendocrine cell secretions influence sensory nerves that can then set up reflex regulation of wider areas of the prostate (Iwanaga *et al.*, 1994). According to Iwanaga *et al.* (1994), the neuroparaneuronal connection in the urethra may play an important role in the serotonin-evoked urethrogenital reflex. Intestinal and urethral NE cells serotonin-positive may release serotonin in response to luminal stimuli and directly activate adjacent peptidergic neurons to initiate the reflex arcs.

The histochemical, immunohistochemical and ultrastructural observations does not show significant morphological alterations in the cells NE of the alcoholic groups. In accordance with features of the urethral epithelium and of the NE cells of the UChA and UChB male rats, it believes that such strains are adapted to the consumption of 10% ethanol.

Conclusion

The chronic consumption of ethanol induces morphological alterations in the epithelial cells of the urethra of UChA and UChB rats, evidenced by the presence of lipid drops. The NE cells of the urethra of UChA and UChB rats did not suffer significant alterations under effect of the 10% ethanol. These cells possess histochemistry, immunohistochemistry and ultrastructural features similar to the NE cells of organs of the urogenital, respiratory and digestive systems of others mammals. There is structural association among the NE cells and the nervous fibers in the urethra of Wistar, UChA and UChB rats.

Acknowledgements

The technical assistance of Marcos R. Franchi is acknowledged. The research was supported by Grants no. 2001/13712-1 from the Foundation for Research Support of São Paulo (FAPESP) and from the CAPES (Brazil/DS).

References

Alm P & Collem S (1982) A histochemical and ultrastructural study of human urethral uroepithelium. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect A.* **90**, 103-11

Azzopardi JG, Evans DJ (1971) Argentaffin cells in prostatic carcinoma: differentiation from lipofuchisin and melanin in prostatic epithelium. *J. Pathol.* **104**, 247

Deftos LJ (1991) Chromogranin A: Its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr. Rev.* **12**, 181-7

Di Sant'Agnese PA, De Mesy Jensen, KL (1984) Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra. An ultrastructural study. *Human Pathol.* **15**, 1034-41

Di Sant'Agnese PA, De Mesy Jensen, KL (1989) Myelinoid bodies in endocrine-paracrine (neuroendocrine, APUD) cells of the prostatourethral region. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **21(3)**, 557-64

Di Sant'Agnese PA (2000) Divergent neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Seminars in Diagnostic Pathology* **17(2)**, 149-61

Di Sant'Agnese PA (1998) Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: A review of morphologic aspects. *Urology* **51 (Suppl 5A)**, 121-4

Dixon JS, Gosling, JA, Ramsdale DR (1973) Urethral chromaffin cells: A light and electron microscopy study. *Z. Zellforsch.* **138**, 397-406

Feyter F (1951) Zur pathologie des urogenitalen Helle-zellen system. *Virch. Arch. Path. Anat.* **320**, 567

Fujita, T (1980) Paraneuron, its current implication. *Biomed. Res.* **1** (Suppl.): 3-9

Furnes JB, Costa M (1982) Identification of gastrointestinal neurotransmitters. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (ed. Bertaccini G), Vol. 59, Chapt.1, 383-462. Berlin: Springer

Grimelius L (1968) A silver nitrate stain for alpha 2 cells in human pancreatic islets. *Acta Societa Medica Uppsala* **73**, 243

Hakanson R, Larsson LI, Sjöberg NO, Sundler E (1974) Amine-producing endocrine-like cells in the epithelium of urethra and prostate of guinea pig. A chemical fluorescence histochemical and electron microscopic study. *Histochemistry* **38**, 259-70

Iwanaga T, Han H, Hoshi O, Kanazawa H, Adachi I, Fujita T (1994) Topographical relation between serotonin-containing paraneurons and peptidergic neurons in the intestine and urethra. *Biol. Signals* 1994, **3**(5), 259-70

Kazzaz BA (1974) Argentaffin and argyrophil cells in the prostate. *J. Pathol.* **112**, 189-93

Lendon RG, Dixon JS, Gosling JA (1976) The distribution of endocrine-like cells in the human and female urethral epithelium. *Experimentia* **32**, 377-8

Li TK, Lumeng L, McBride WJ, Murphy JM (1987) Rodent lines selected for factors affecting alcohol consumption. *Alcohol Alcohol Suppl* **1**, 91-6

Lieber CS & De Carli LM (1991) Hepatotoxicity of ethanol. *J. Hepathol.*, **12**, 394-401

Lillie RD, Glenner GG. (1960) Histochemical reactions in carcinoid tumours of the human gastrointestinal tract. *Amer. J. Path.* **36**, 623

Maher, JJ (1997) Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health & Research World*, **21** (1), 5-12

Martinez FE, Martinez M, Padovani CR (2000) Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **32**(2), 175-84

Mc Clearn E, Rodgers DA (1961) Genetic factors in alcohol preference of laboratory mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **54**, 116-9

Pearse AGE (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells (The APUD series) and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 303-13

Pinheiro PFF, Almeida CCD, Segatelli TM, Martinez M, Padovani CR, Martinez, FE (2003) Ultrastructure of the urethra of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *World J. Urology* **20** (6), 378-84

Ramsdale DR (1974) Further observations on urethral chromaffin cells. *Cell Tissue Res.* **148**, 499

Reichlin S (1983a) Somatostatin I. *N. Engl. J. Med.* **309**, 1495-501

Reichlin S (1983b) Somatostatin II. *N. Engl. J. Med.* **309**, 1556-63

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **171**, 65-72

Sasaki A, Yoshinaga K (1989) Immunoreactive somatostatin in male reproductive system in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **68**, 996-9

Verlander JW (1998) Normal ultrastructure of the kidney and lower urinary tract. *Toxicol. Pathol.* **26**, 1-17

Vittoria A, La Mura E, Cocca T, Cecio A (1990) Serotonin, somatostatin and chromagranin A-containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. *J. Anat.* **171**, 169-78

Watson ML (1958) Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 727-30

Histologia e Ultra-estrutura da Uretra Peniana e da Célula Neuroendócrina de Ratos UChA e UChB (Bebedores Voluntários de Etanol)

P. F. F. Pinheiro^{1,2}, T. M. Segatelli³, C. C. D. Almeida^{1,2}, M. Martinez⁴, C. R. Padovani⁵ and F.E. Martinez²

¹*Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;* ²*Department of Anatomy, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil;* ³*UEM, Department of Morphology and Physiology, Maringá -PR, Brazil;* ⁴*Department of Morphology and Pathology, UFSCar, São Carlos, SP, Brazil,* ⁵*Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil*

Correspondence to Patricia Fernanda Felipe Pinheiro - Department of Anatomy, Biosciences Institute, UNESP, Campus of Botucatu – Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu-SP, Brazil, CEP:18618-000, Caixa Postal: 510 - ☎ (5502114) 3811-6040 - FAX (5502114) 3811-6361

e-mail: pinheiro_patricia@hotmail.com

Resumo

O alcoolismo é apontado pela OMS como o terceiro maior problema da saúde pública mundial. O uso excessivo de etanol causa alterações significativas no sistema urogenital, porém trabalhos relacionando o consumo crônico dessa substância à morfologia uretral são inéditos. Dessa forma, o presente trabalho tem com objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos da ingestão de etanol sobre a morfologia do epitélio uretral peniano de ratos UChA (bebedores de baixas concentrações de etanol) e UChB (bebedores de altas concentrações de etanol), selecionados geneticamente para a livre escolha no consumo de álcool. Utilizou-se 74 ratos das linhagens UChA, UChB e Wistar de três meses de idade. Os animais foram submetidos à perfusão com solução fixadora de Formaldeído a 10%, de Bouin e de Karnovsky. Posteriormente, a uretra peniana foi submetida a técnicas convencionais de histologia, de histoquímica, de imunohistoquímica, de ultra-estrutura e de morfometria. O epitélio da mucosa uretral peniana apresentou quatro tipos celulares: basal, intermediário, superficial e neuroendócrino (NE). A célula basal apresentou-se polimórfica com núcleos apresentaram-se condensados e matriz citoplasmática elétron-densa (células escuras), rica em polirribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso, microfilamentos intermediários similares aos de citoqueratina e mitocôndrias. A célula intermediária apresentou-se polimórfica, exibindo citoplasma claro. Nos grupos experimentais UChA e

UChB, observou-se gotas de lipídio e espaços intercelulares. A célula superficial, à semelhança da intermediária, também por vezes, apresentou complexo de Golgi próximo ao pólo apical. Semelhante às células intermediárias dos grupos experimentais UChA e UChB, observou-se gotas de lipídio na matriz citoplasmática. O grupo UChB apresentou, aparentemente, maior quantidade de gotas de lipídio. A célula NE da caracterizou-se por apresentar vesículas contendo grânulos elétron-densos. Observou-se, freqüentemente, fibras nervosas mielínicas e amielínicas aferentes próximas às células basais e às NE na lâmina própria da uretra peniana das três linhagens de ratos. O consumo crônico de etanol induz alterações morfológicas e fisiológicas no epitélio da ureta peniana de ratos UCh. O etanol provoca atrofia testicular e alterações significativas na testosterona plasmática. As células NE uretrais dos ratos controle e UCh são similares ultra-estruturalmente aos outros tipos celulares do sistema APUD. Os ratos UCh apresentam adaptações à ingestão crônica de etanol.

Palavras-chave: uretra peniana, célula neuroendócrina, ratos UCh, alcoolismo, sistema APUD.

Introdução

A uretra masculina é o local de entrada de microorganismos patógenos transmitidos sexualmente (QUAYLE *et al.*, 1994). No rato, no camundongo e no gerbilo, a uretra é dividida em pélvica e peniana. A uretra pélvica inicia-se no óstio interno da uretra e termina em nível do bulbo peniano, que contém largo divertículo uretral, expansão da uretra peniana. A uretra peniana inicia-se no bulbo peniano e termina no óstio externo da uretra (HAYES, 1965; HUMMEL *et al.*, 1966; HEBEL & STROMBERG, 1976; PINHEIRO *et al.*, 2003a). O epitélio da mucosa uretral peniana do homem, do rato e do gerbilo apresenta quatro tipos celulares: basal, intermediário, superficial e neuroendócrino (NE) (DIXON *et al.*, 1973; HAKKY, 1979; PINHEIRO *et al.*, 2003b).

As células (NE) uretrais e prostáticas são também conhecidas como endócrinas-parácrinas ou células APUD (*amine precursors uptake and decarboxylation*), pertencentes ao Sistema Neuroendócrino Difuso proposto por Feyter em 1938. Trata-se de uma célula reguladora com características epitelial, neural e endócrina, contendo uma variedade de peptídeos ou neuropeptídeos (DI SANT'AGNESE *et al.*, 1984; VITTORIA *et al.*, 1990; PINHEIRO *et al.*, 2003b). As células NE da região uretro-prostática foram primeiramente descritas por PRETL em 1944.

Estudos histoquímicos, imunohistoquímicos e ultra-estruturais de células NE prostáticas e uretrais detectaram numerosas subpopulações celulares contendo serotonina, cromogranina (CgA), calcitonina, somatostatina e bombesina. Esses peptídeos podem agir através de mecanismos lumenócrino, endócrino, parácrino e autócrino e estão, provavelmente, envolvidos no crescimento, na diferenciação e nas funções secretoras da próstata. Funções parácrinas, como secreção intraluminal de peptídeos, podem influenciar a constituição do ejaculado e modificar as funções específicas do plasma seminal (APRIKIAN *et al.*, 1998, DI SANT'AGNESE, 2000).

As células NE da próstata e da uretra possuem formas variadas, destacando-se a presença de expansões citoplasmáticas similares aos processos dendríticos, estendendo-se às células epiteliais adjacentes. Essas expansões mantêm o contato das células NE com os outros tipos celulares presentes no epitélio (DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN, 1984 e 1985).

Alguns investigadores relatam que as células NE da próstata têm origem no endoderma, como as do sistema gastro-enteropancreático, outros inferem que se originam de precursoras indiferenciadas, como as células basais ou *stem cell*. AUMÜLLER *et al.* (1999), em estudo sobre a origem das células endócrinas da próstata humana, concluíram que as células NE são de origem neurogênica, ou seja, derivam da crista neural. XUE *et al.* (2001) observaram que células CgA positivas estavam presentes no epitélio e no estroma prostático. Consideraram as últimas como sendo de origem paraganglionar.

A uretra sofre ação direta e indireta dos produtos do metabolismo da oxidação do etanol, porém estudos que relacionam a morfologia do epitélio uretral aos efeitos do alcoolismo crônico ainda não foram realizados.

Nos últimos anos houve aumento significativo da produção de bebidas alcoólicas, acompanhado pelo seu grande consumo, fato que tem provocado aumento dos problemas médicos e psicossociais relacionados com o uso abusivo e a dependência alcoólica (DE LIMA, 1997).

Por mais de meio século, pesquisadores tentam conduzir estudos sobre os efeitos do alcoolismo crônico utilizando modelos animais (TABAKOFF & HOFFMAN, 2000). Os roedores utilizados em laboratório constituem modelos experimentais, com preferências ao consumo de álcool. Observações sugerem que os animais preferem primeiramente o álcool por causa do sabor ao invés do seu efeito estimulador sobre o sistema nervoso central. A alta variabilidade na preferência do álcool entre os indivíduos e entre as linhagens permitiu aos estudiosos selecionarem linhagens de ratos e camundongos para a preferência ao álcool, gerando pares de animais que são caracterizados por consumir, voluntariamente, níveis baixos ou altos de álcool (SPANAGEL, 2000).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a histologia, a histoquímica, a imunohistoquímica e a ultra-estrutura da uretra peniana e das células NE em ratos UChA e UChB, bebedores voluntários de etanol, contribuindo com os estudos sobre as alterações do sistema urogenital frente ao alcoolismo crônico experimental.

Material e Métodos

Animais

No presente trabalho, foram utilizados 74 ratos adultos do sexo masculino com três meses de idade das linhagens UChA, UChB e Wistar provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, UNESP - *Campus* de Botucatu. Durante o estudo, os animais receberam dieta sólida (ração Nuvital[®]) e água *ad libitum*, sendo alojados em caixas individuais com fundo sólido, forradas com maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de luz e 12h de escuro) e temperatura (20 à 25°C). Os animais foram divididos em três grupos: (1°) um grupo de ratos UChA de consumo baixo voluntário de etanol a 10% (água + etanol), (2°) um grupo de ratos UChB de consumo alto voluntário de etanol a 10% e (3°) um grupo de ratos Wistar de consumo voluntário de água, utilizado como controle dos ratos das linhagens que, naturalmente, consomem álcool (UCh). O consumo de etanol (g/Kg/dia) das linhagens UChA e UChB foi avaliado durante 14 dias consecutivos. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

1. Microscopia de Luz

Inclusão em parafina (Paraplast Plus[®])

Os animais foram anestesiados com éter etílico e perfundidos com solução de Bouin ou Formaldeído a 10% através do ventrículo esquerdo do coração. Posteriormente, a uretra peniana foi isolada, coletada e fixada em solução de Bouin ou em Formaldeído a 10% por 24h, lavadas em álcool 70%, desidratadas, diafanizadas, incluída em paraplástico e cortada com quatro a cinco micrometros e coradas por meio de técnica histológica, histoquímica e imunohistoquímica. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Calleja (C), Tricrômico de Masson (TMA) e Picrosirius Red (PSR). As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BH-2 e Axiophot 2, Zeiss, do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP - *Campus* de Botucatu, utilizando-se filme Kodacolor Gold 100.

Método argirófilo de Grimelius (1968)

As lâminas com cortes histológicos foram mantidas em solução de nitrato de prata a 10% a 65°C por 3 horas. A seguir as lâminas foram lavadas em água destilada e submetidas à solução de redução de Grimelius a 65°C por 1 minuto. Após essa etapa, as lâminas receberam novos banhos em solução de prata a 10%, seguida em água destilada e solução de redução de Grimelius a 65°C por 1 minuto cada. A seguir, as lâminas foram lavadas com água destilada, contracoradas com verde luz, desidratadas, diafanizadas e montadas com Permount®. As secções foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus BH-2 e Axiophot 2, Zeiss, do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP - *Campus* de Botucatu, utilizando-se filme Kodacolor Gold 100.

Imunohistoquímica

Os cortes da uretra peniana foram desparafinizados em xilol e álcool, lavados em tampão fosfato (PBS) e colocados em solução de água oxigenada (30 V/V) a 3% em PBS durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas em tampão citrato de sódio a 0,01M, pH 6,0 foram levadas ao forno de microondas a 700-800W durante 15 minutos. Posteriormente, as secções foram submetidas à reação com o anticorpo específico anti-serotonina (Serotonin, 5HT-H209, MxH, 1:100, DAKO CYT®, Copenhagen, Denmark), e foi deixado incubar em câmara úmida durante a noite a 4°C em geladeira. Após a incubação as lâminas foram lavadas com tampão PBS e durante 1 hora à temperatura ambiente as secções foram incubadas com anticorpo secundário anti-mouse (biotinylated anti-mouse IgG (H+L) made in horse, 1:160, Vector Laboratories®, Burlingame, USA). Após essa etapa, os cortes foram lavados com PBS e submetidos à solução de avidina-biotina-peroxidase (Vecstain Elite ABC Standard, Vector Laboratories®, Burlingame, USA) por 45 minutos, seguida pela exposição à diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos e contrastadas com hematoxilina por 1 minuto. Durante a realização desta técnica foram obtidos controles positivos e negativos utilizando-se o duodeno de rato dos três grupos experimentais. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus BH-2 do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP - *Campus* de Botucatu, utilizando-se filme Kodacolor Gold 100.

2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Cinco animais de cada grupo experimental foram anestesiados com éter e perfundidos solução de Karnovsky (pH 7,2) através do ventrículo esquerdo do coração. Fragmentos da uretra peniana, de aproximadamente 0,5 à 1,0mm, foram fixados com solução de Karnovsky por três horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante duas horas no escuro. Um terceiro fixador, acetato de Uranila, 0,5% em água com sacarose 13,3% foi usado durante duas horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em soluções em série crescente de acetona (50 até 100%) e incluídos em resina (Araldite 506). Cortes finos (0,5 µm) foram corados com azul de toluidina e analisados em microscopia de luz. Os cortes ultra-finos (60 à 80 nm), obtidos em ultramicrotomo LBK BROMA 8800 ULTRATOME, foram corados com acetato de uranila (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), analisados e fotografados no MET PHILLIPS EM 301 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu.

3. Dosagem Hormonal

O sangue dos animais dos grupos controle, UChA e UChB foi coletados após decapitação e a concentração de testosterona (T) no plasma sanguíneo foi analisada. Para a detecção dos níveis hormonais, utilizou-se o método de radioimunoensaio (RIA) (Coat-A-Count Total Testosterone kit, DPC®). O exame para detecção dos níveis de T foi realizado junto ao Laboratório de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, UNESP. Os valores da concentração plasmática de T foram dados em ng/dL e estão sumarizados na Tabela 2.

4. Morfometria

Cinco ratos de cada grupo foram utilizados. Os blocos de parafina, utilizados na microscopia de luz, foram cortados com quatro a cinco micrometros de espessura, corados com H.E. e medidas as alturas (100 medidas/animal) do epitélio da uretra peniana desde a membrana basal até o ápice da célula. As variáveis descritas foram analisadas através do

programa de análise de imagens KS 300, versão 3.0, Zeiss (INFRA III — FAPESP, Proc. 96/09979-2) do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu.

5. *Análise Estatística*

Os pesos corpóreo em gramas (g), do conjunto vesícula seminal e glândula de coagulação (g), dos testículos direito e esquerdo (g) dos grupos controle, UChA e UChB foram analisados através da análise de variância para o modelo com um fator, complementado com as comparações múltiplas de Tukey (ZAR, 1996), considerando-se o nível de 5% de significância. A concentração plasmática de testosterona (ng/dL) dos grupos controle, UChA e UChB foi analisada através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com as comparações múltiplas (ZAR, 1996). O consumo de etanol (g/Kg/dia) dos grupos UChA e UChB foi avaliado através do teste T de Student para amostras independentes (ZAR, 1996). A altura do epitélio da uretra peniana (μm) dos grupos controle, UChA e UChB foi avaliada através da análise multivariada dos perfis médios dos grupos, complementada com as comparações múltiplas simultâneas (JOHNSON & WICHERN, 1992).

Resultados

A mucosa uretral, que em alguns momentos apresentou dobras, possui epitélio contituído de quatro tipos celulares: basal, intermediário, superficial (Fig. 1A-F) e neuroendócrino (NE) (Fig. 3A-D, 4B, 6D). Observou-se lâmina própria constituída de fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos e fibras nervosas mielínicas e amielínicas (Fig. 1B, 2B, 5B). Em certos pontos, a lâmina própria apresentou projeções em direção ao epitélio (Fig. 1C e F). Nas amostras observadas, não houve resultados positivos para a marcação histoquímica com prata e imunohistoquímica para serotonina.

Célula Basal (Fig. 1A-C, 2A-C, 4A, 5A-C)

Ao microscópio de luz, a célula basal apresentou-se polimórfica. Os núcleos apresentaram-se altamente condensados comparados aos das outras camadas celulares. Ao microscópio eletrônico de transmissão, a célula basal apresentou matriz citoplasmática elétron-densa (células escuras), rica em polirribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso, microfilamentos intermediários similares aos de citoqueratina e mitocôndrias. O núcleo apresentou-se com reentrâncias e nucléolo evidente.

Nos grupos experimentais UChA e UChB, observou-se espaços intercelulares entre as células basais e as intermediárias preenchidos por prolongamentos citoplasmáticos. As células basais apresentaram-se conectadas às intermediárias através de desmossomas e interdigitações citoplasmáticas. As células basais apresentaram-se fixas à lâmina basal através de hemidesmossomas. A matriz citoplasmática mostrou-se similar à do grupo controle.

Célula Intermediária (Fig. 1A-C, 2A-D, 3A-B, 4A-B, 5A-B e 6A)

A célula intermediária apresentou-se polimórfica, exibindo citoplasma claro. Entre as células intermediárias adjacentes e entre as basais, observou-se desmossomas e interdigitações citoplasmáticas elétron-densas. As mitocôndrias redondas e ovaladas distribuíram-se ao redor do núcleo. A presença do complexo de Golgi foi raramente observada. O retículo endoplasmático rugoso, localizado próximo ao núcleo, por algumas vezes, apresentou-se na forma de lamelas concêntricas. Polirribossomos foram observados

em todo o citoplasma. O núcleo, polimórfico, exibiu reentrâncias, nucléolo evidente e fina camada de heterocromatina. Nos grupos experimentais UChA e UChB, observou-se gotas de lipídio e espaços intercelulares preenchidos por prolongamentos citoplasmáticos. O grupo UChB apresentou, aparentemente, maior quantidade de gotas de lipídio.

Célula Superficial (Fig. 1A-C, 2A e D, 3C, 4A, 6B)

A célula superficial, à semelhança da intermediária, também por vezes, apresentou complexo de Golgi próximo ao pólo apical. Na matriz citoplasmática, observou-se mitocôndrias elétron-densas, alongadas e redondas com cristas abundantes, retículo endoplasmático rugoso uniforme, exibindo ou não, lamelas concêntricas e polirribossomos livres. O núcleo, volumoso apresentou-se colunar ou esférico. Heterocromatina delicada e uniforme marcou o contorno regular do núcleo. O ápice celular exibiu microvilos curtos e uniformes. Células superficiais vizinhas apresentaram desmossomas e interdigitações citoplasmáticas proeminentes. Semelhante às células intermediárias dos grupos experimentais UChA e UChB, observou-se gotas de lipídio na matriz citoplasmática. O grupo UChB apresentou, aparentemente, maior quantidade de gotas de lipídio.

Célula Neuroendócrina (Fig. 3A-D, 4B e 6D)

A célula NE da linhagem Wistar apresentou matriz citoplasmática rica em polirribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias elétron-densas com cristas proeminentes agrupadas próximas ao núcleo e filamentos intermediários semelhantes aos de citoqueratina. Vesículas circulares contendo grânulos elétron-densos localizados no centro ou próximos à membrana com halo ao seu redor. Espaços intercelulares preenchidos por expansões citoplasmáticas foram observados. As células NE das linhagens UChA e UChB apresentaram matriz citoplasmática preenchida por filamentos citoplasmáticos e por vesículas com grânulos similares às da linhagem Wistar, porém em menor número. Observou-se, frequentemente, fibras nervosas mielínicas e amielínicas aferentes próximas às células basais e às NE na lâmina própria da uretra peniana das três linhagens de ratos.

O peso corpóreo (PC) foi maior nos grupos controle e UChA. Porém, a média do peso da vesícula seminal (VS) + glândula de coagulação (GC) mostrou-se maior no grupo UChB. O peso dos testículos (T) foi menor nos grupos UChA e UChB comparados ao do grupo controle, fato que se repete em relação ao índice T/PC. O índice VS+CG/PC foi maior no grupo UChB (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos pesos (g) corpóreo (PC), do conjunto vesícula seminal e glândula de coagulação (VS+GC), dos testículos (T) direito e esquerdo juntos, os índices médios dos órgãos em relação ao peso corpóreo dos animais estudados e respectivos resultados do teste estatístico:

Peso	Grupo			Resultado do Teste Estatístico
	Controle	UChA	UChB	
PC	429,20±65,74b	401,73±40,79b	368,11±46,42a	10,68 (P<0,001)
VS + GC	1,55±0,22a	1,44±0,25a	1,79±0,37b	8,22 (P<0,001)
T	1,66±0,16b	1,47±0,20a	1,37±0,18a	15,02 (P<0,00001)
T/PC	0,0041±0,0006a	0,0035±0,0006a	0,0037±0,0007a	2,68 (P>0,05)
VS+CG/PC	0,0038±0,0008a	0,0035±0,0007a	0,0048±0,0009b	15,15 (P<0,00001)

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

A Tabela 2 mostra que não houve diferença significativa na concentração de testosterona nos grupos estudados.

Tabela 2. Mediana e semi-amplitude total da concentração plasmática de testosterona (ng/dL), segundo grupo e respectivo resultado do teste estatístico:

Controle	UChA	UChB	Resultados do Teste Estatístico
171,02±146,86a	90,07±79,41a	192,92±145,88a	2,71 (P>0,05)

Medianas seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

A Tabela 3 mostra que houve diferença significativa no consumo de etanol nos grupos estudados. O grupo UChA apresentou o menor consumo de etanol.

Tabela 3. Média e desvio-padrão do consumo de etanol (g/Kg/dia), segundo grupo e respectivo resultado do teste estatístico:

UChA	UChB	Resultados do Teste Estatístico
5,86±1,44a	7,16±2,22b	2,39 (P<0,05)

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si.

A Tabela 4 mostra que não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Tabela 4. Média e desvio-padrão da altura do epitélio da uretra peniana (µm) segundo grupo:

Grupo	Altura do epitélio
Controle	94,73±6,22a
UChA	100,79±9,02a
UChB	104,01±7,02a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

Figura 1. Epitélio da uretra peniana de ratos controle (Wistar). Em A célula basal (B) intermediária (I) e superficial (S), lâmina própria (LP) com fibras colágenas (verde). (TMa. 2700X). Detalhe do epitélio da uretra peniana. Reação PAS positiva na região apical do epitélio (seta). (1600X). Em B epitélio da uretra peniana de ratos UChA. Célula basal (B) intermediária (I) e superficial (S). Observar aparente hipertrofia celular. (HE. 2000X). Detalhe do epitélio corado com PAS. Observar reação PAS positiva na região apical do epitélio uretral. (2650X). Em c epitélio da uretra peniana de ratos UChB. Célula basal (B) intermediária (I) e superficial (S), lâmina própria (LP) com fibras colágenas (verde). (TMa. 2133X). Detalhe do epitélio uretral. Observar reação PAS positiva na região apical celular e a aparente hipertrofia do epitélio uretral. (2400X). Em D epitélio da uretra peniana de ratos controle (Wistar). Observar lâmina própria com fibras colágenas (verde) e fibras elásticas (marrom). (C. 700X). Em E epitélio da uretra peniana de ratos UChA. Observar lâmina própria com glândula (G) e ducto (D) uretrais e secreção na luz da uretra (S). (TMa. 933X). Em F epitélio da uretra peniana de ratos controle (Wistar). Observar lâmina própria (LP) constituída por fibras colágenas (púrpura). C: PSR. 1600X.

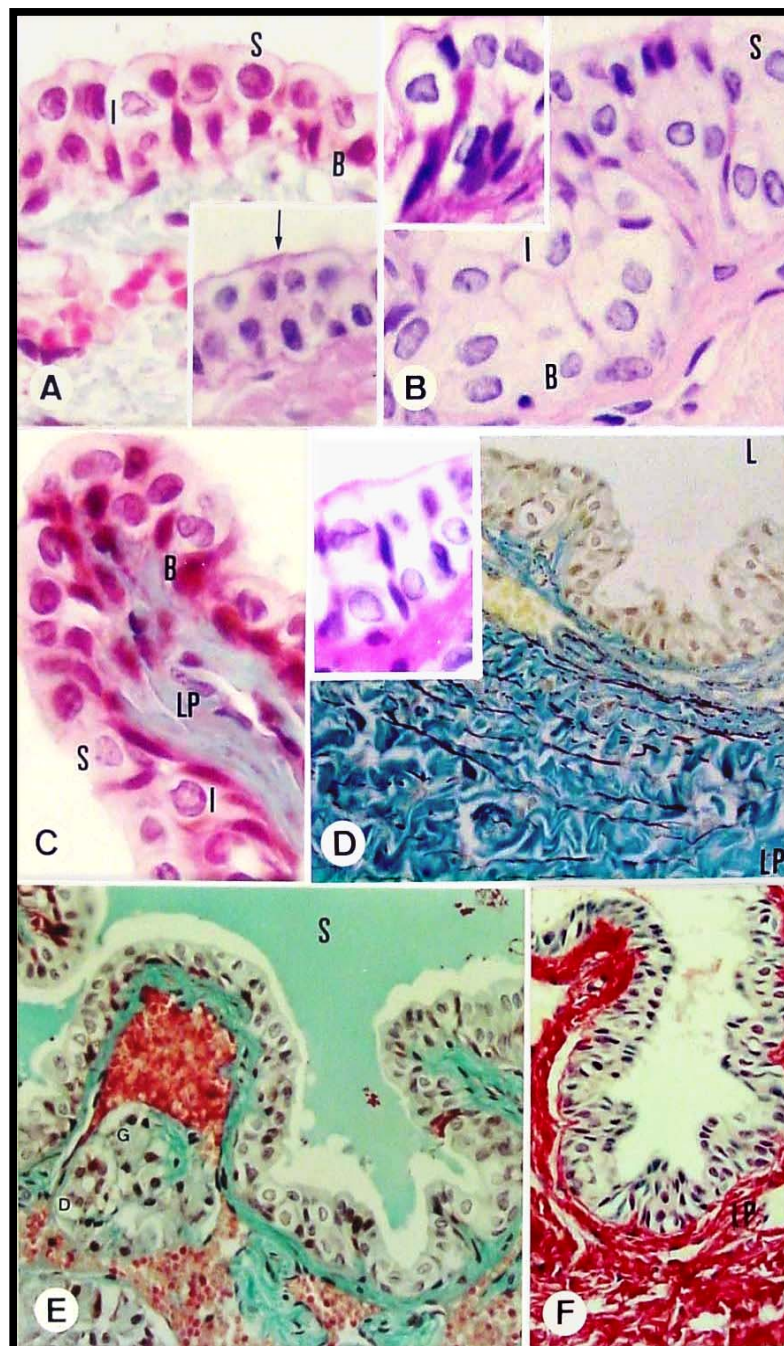


Figura 2. Elétron-micrografias da uretra peniana do grupo controle. Em A célula basal (B), intermediária (I) e superficial (S), núcleos com reentrâncias (N), retículo endoplasmático rugoso na forma de lamelas concêntricas (seta), lâmina própria com fibrilas colágenas (FC) e luz da uretra (L) com microvilos (cabeça de seta). (3250X). Em B em célula basal (B) com filamentos intermediários similares aos de citoqueratina (seta), célula intermediária (I), retículo endoplasmático rugoso (RER), lâmina própria com fibrilas colágenas (estrela) e mielínicas (FM) e lâmina basal com hemidesmosmos (cabeça de seta). (4500X). Em C célula basal (B), filamentos intermediários similares aos de citoqueratina (seta), célula intermediária (I) e gotas de lipídio (cabeça de seta). (13250X). Em D célula intermediária (I) e superficial (S), núcleos com reentrâncias (N), interdigitações (cabeça de seta) e luz da uretra (L) com microvilos curtos (seta). (6355X).

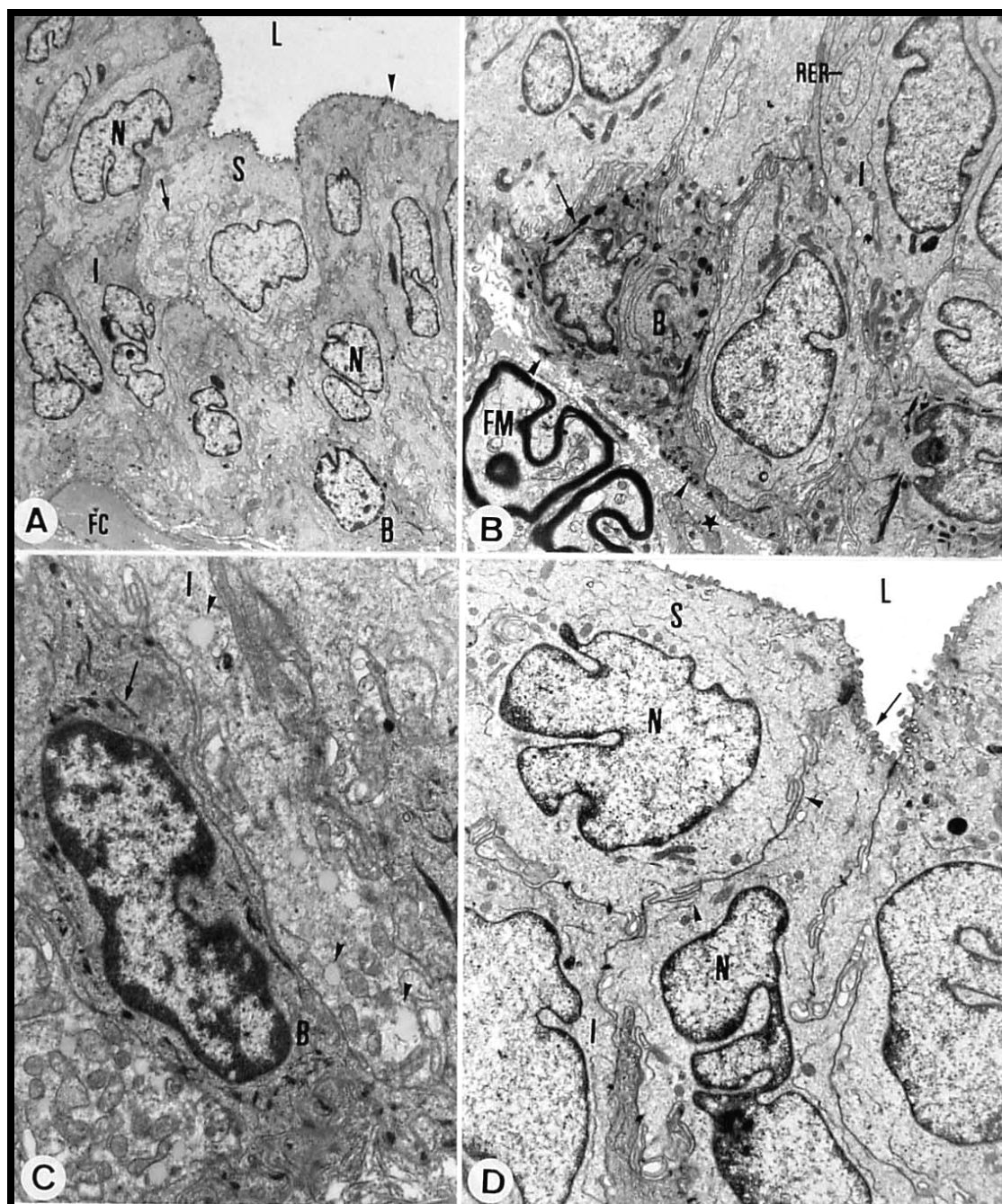


Figura 3. Elétron-micrografias da uretra peniana de ratos controle (Wistar). Em A célula basal (B), parte do citoplasma da célula NE (NE), células intermediárias (I), núcleo com reentrância (N), mitocôndrias (M), gota de lipídio (estrela) e interdigitações citoplasmáticas (seta). (6000X). Em B célula NE (NE), vesículas neurosecretoras (cabeça de seta), mitocôndrias agrupadas (estrelas), célula intermediária (I), retículo endoplasmático rugoso (RER) e lâmina própria com fibrilas colágenas (FC). (9882X). (C). Célula NE (NE), complexo de Golgi (G), vesículas neurosecretoras (seta), mitocôndrias (M), centríolo (C), célula superficial (S), luz da uretra (L) com microvilos curtos (cabeça de seta). (12600X). Em D detalhe do citoplasma da célula NE. Vesículas vazias ou contendo grânulos neurosecretores. (cabeça de seta). Os grânulos ocupam o centro da vesícula ou estão deslocados junto à membrana vesicular, mitocôndria (M), filamentos intermediários similares aos de citoqueratina (seta). (17333X).

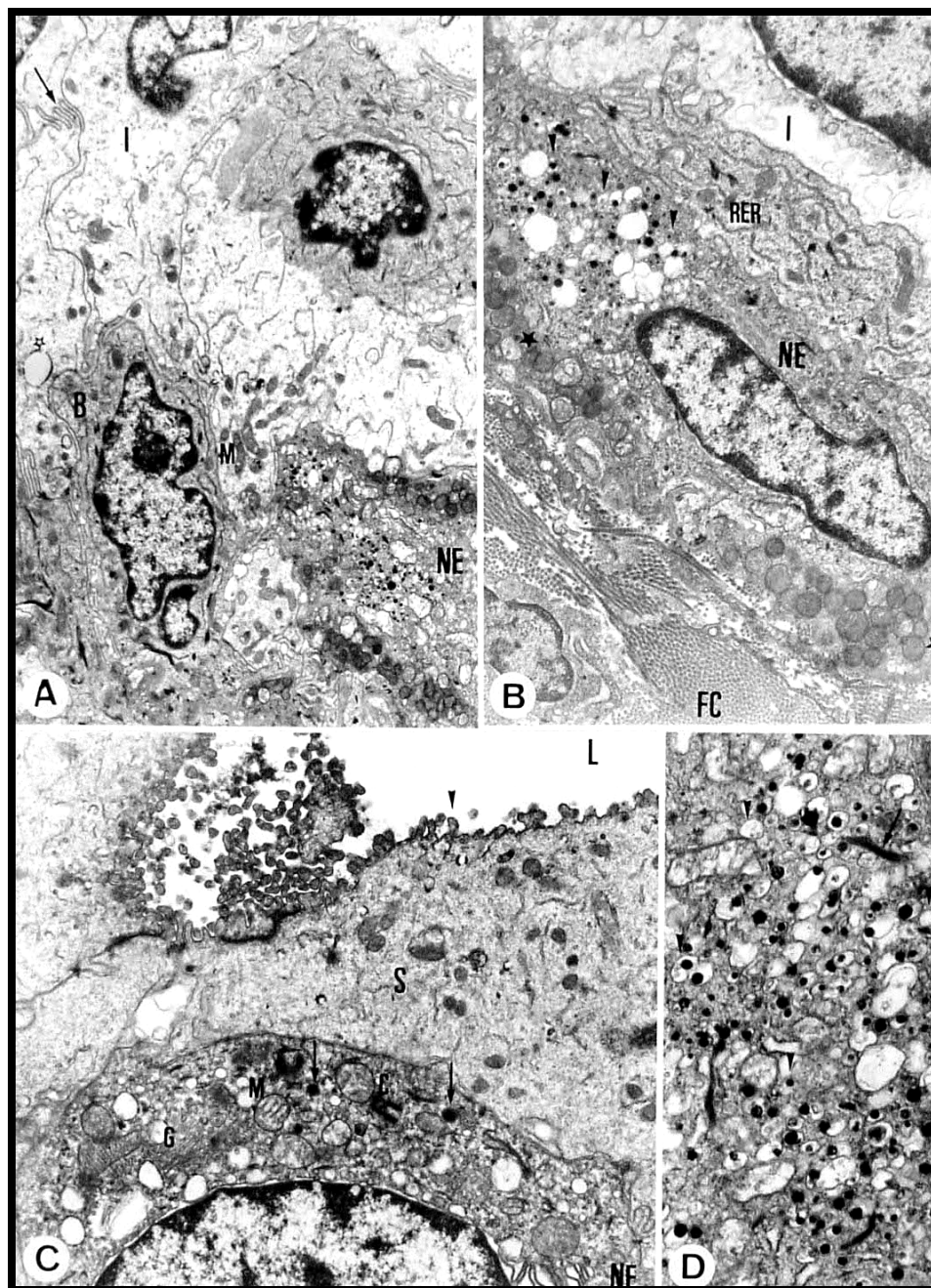


Figura 4. Elétron-micrografias da uretra peniana de ratos UChA. Em A célula basal (B), intermediária (I) e superficial (S), interdigitações citoplasmáticas (seta), luz da uretra (L) com microvilos curtos (cabeça de seta) e secreção (estrela). (2610X). Em B célula NE (NE) exibindo vesículas neurosecretores (seta), interdigitações citoplasmáticas (cabeça de seta), célula intermediária (I). (7750X). Detalhe de vesículas vazias e contendo grânulos neurosecretores, cuja localização é central ou periférica na vesícula. (42000X). Em C célula basal (B), núcleo com reentrâncias (N), filamentos intermediários similares aos de citoqueratina (seta), retículo endoplasmático rugoso (RER) e espaços intercelulares (roseta). 13250X; Em D interdigitações citoplasmáticas entre as células intermediárias e superficiais. (13250X).

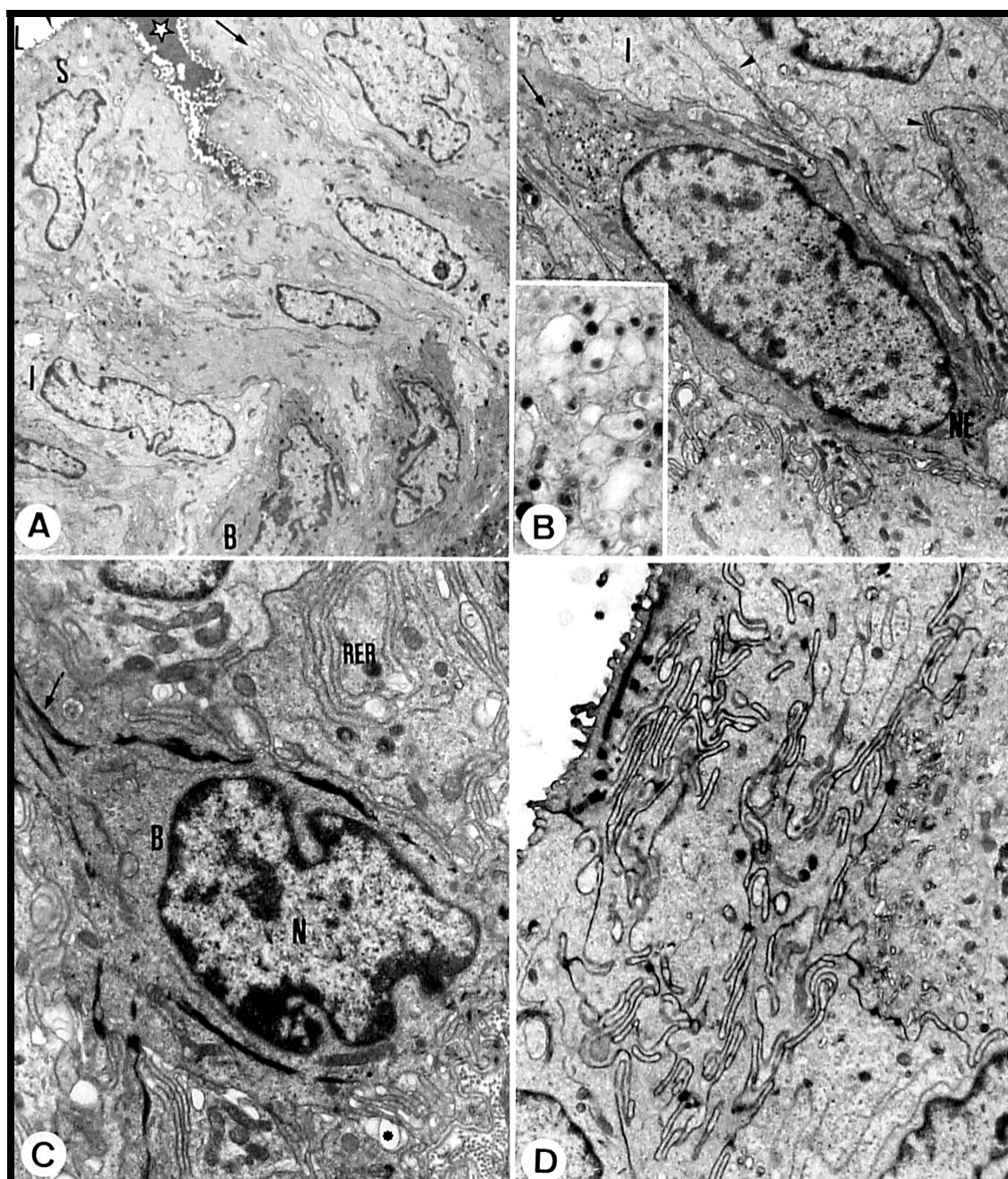


Figura 5. Elétron-micrografias da uretra peniana de ratos UChB. Em A célula basal (B), intermediária (I) e superficial (S), núcleos com reentrâncias (N), lâmina própria com fibrilas colágenas (estrela), mielínicas (FM) e amielínicas (roseta), luz da uretra (L) com microvilos curtos e uniformes (cabeça de seta). (3250X). Em B célula basal (B), intermediária (I), lâmina própria com fibrilas colágenas (estrela), mielínicas (FM) e amielínicas (roseta). (5750X). Em C célula basal (B), núcleo (N), filamentos intermediários de citoqueratina (seta), lâmina basal (cabeça de seta), fibrilas colágenas (estrela). (23000X). Em D célula intermediária (I), núcleo (N), gotas de lipídio (asteriscos). (23000X).

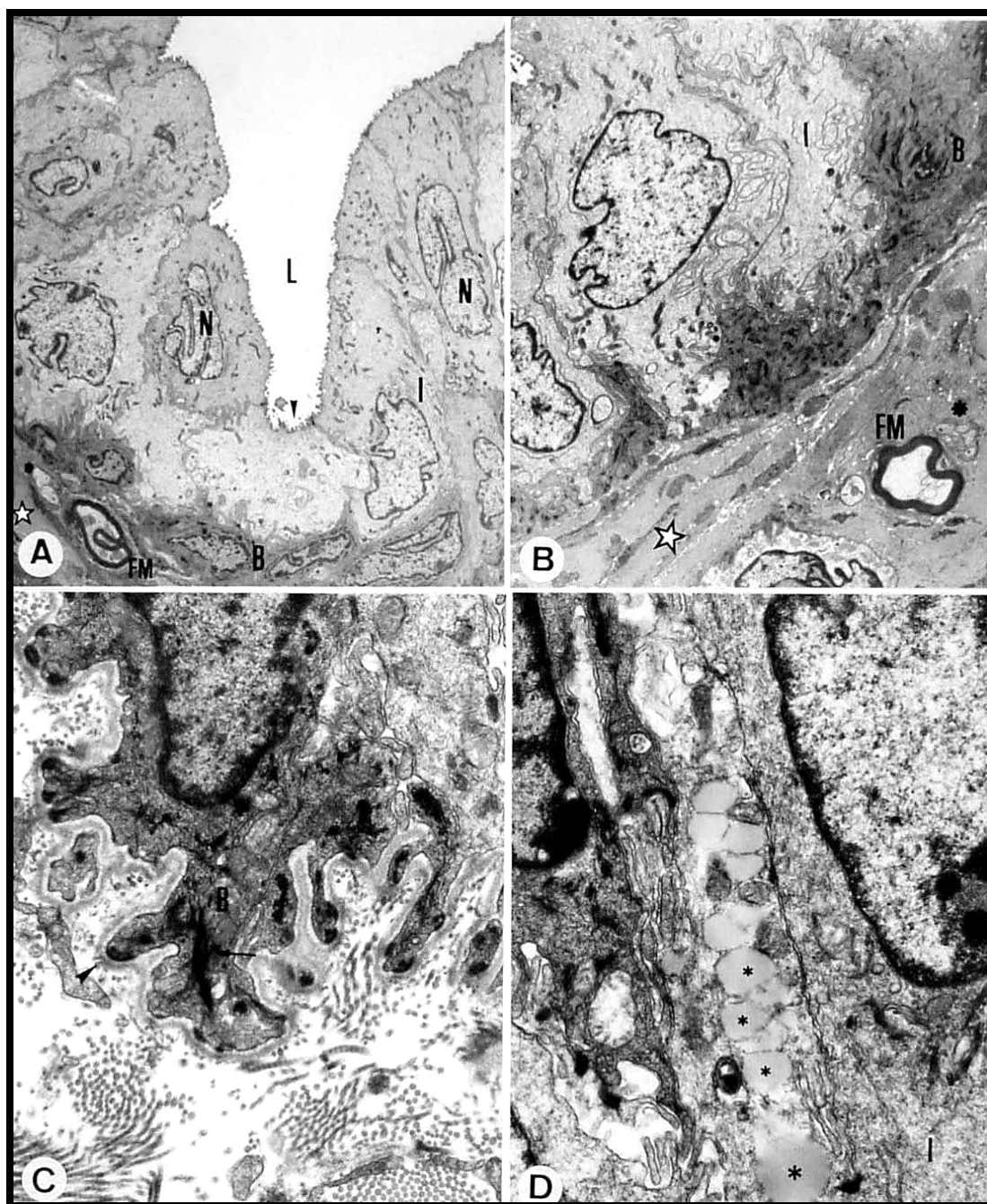
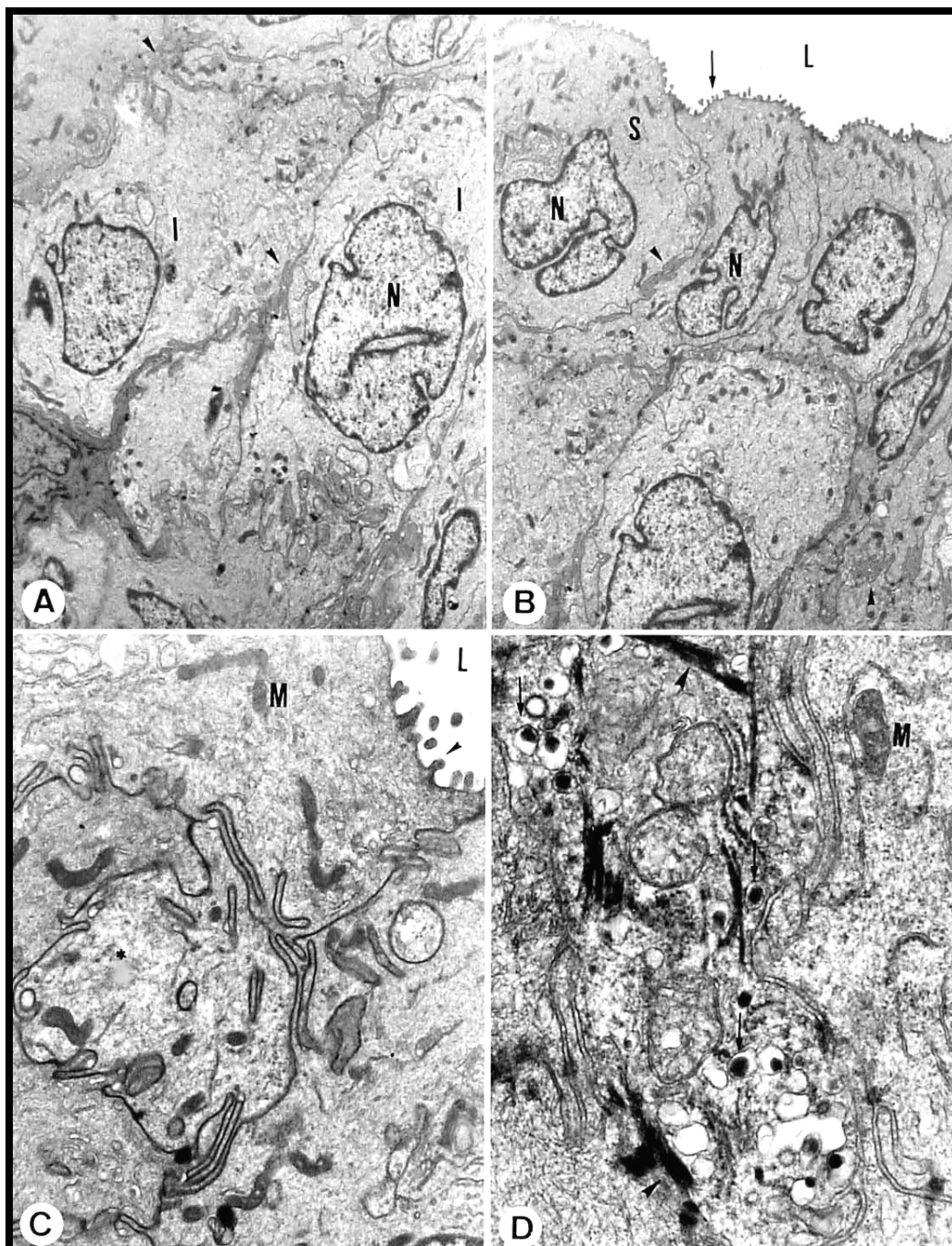


Figura 6. Elétron-micrografias da uretra peniana de ratos UChB. Em A células intermediárias (I), núcleo com reentrância (N), interdigitações citoplasmáticas (cabeça de seta) e retículo endoplasmático rugoso (RER). (5750X). Em B células superficiais (S), núcleos com reentrâncias (N), interdigitações citoplasmáticas (cabeça de seta) e luz da uretra (L) com microvilos curtos (seta). (5750X). Em C interdigitações citoplasmáticas entre as células intermediárias e superficiais. Mitocôndrias (M), gota de lipídio (roseta) e luz da uretra (L) com microvilos curtos (cabeça de seta). (17000X). Em D parte do citoplasma da célula NE. Vesículas vazias ou contendo grânulos neurosecretóres (setas) e filamentos intermediários de citoqueratina (cabeça de seta), mitocôndria (M). (9450X).



Discussão

Em termos gerais, a uretra peniana dos grupos controle, UChA e UChB apresentou células basais, intermediárias, superficiais e neuroendócrinas (NE) similar à uretra peniana do homem (HAKKY, 1979) e do gerbilo da Mongólia (PINHEIRO *et al.*, 2003 a, b). As células basais da uretra peniana dos grupos estudados apresentaram núcleos altamente condensados, matriz citoplasmática rica em polirribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e microfilamentos intermediários similares aos de citoqueratina. Células basais prostáticas, referidas como células de reserva (*stem cell*) ou célula não secretora possuem formas fusiformes, núcleos escuros e usualmente pequenos, matriz citoplasmática rica em polirribossomos livres, sugerindo alto potencial de crescimento (DERMER, 1978; CHEVALIER *et al.*, 1981; HAZEM *et al.*, 2002). A julgar pela semelhança ultra-estrutural da célula basal uretral com a prostática, sugere-se que possua funções semelhantes (reserva). DEANE & WURZELMANN (1965) concordam que a presença das células basais é sempre interpretada como sendo células de reserva importantes na modulação celular do epitélio (diferenciação). Contudo, esses mesmos autores propuseram que as células basais do epitélio secretor da vesícula seminal de camundongos jovens são originadas por *dediferenciação* das células colunares. GOMES *et al.* (2002) sugeriram que essas células poderiam ter importante papel na distribuição e no transporte de substâncias no epitélio secretor. Segundo esses autores, as células basais apresentariam alterações degenerativas, sob condições experimentais, que supostamente, afetariam os processos de transporte de substâncias no epitélio. Comparando a célula basal da vesícula seminal de camundongos à da uretra peniana de ratos Wistar, UChA e UChB não observou-se similariedade morfológica com as células basais descritas acima, porém novas investigações são necessárias sobre o desenvolvimento pré e pós-natal da uretra dos animais estudados para se inferir dados sobre a origem, a dinâmica e a função dessas células no epitélio uretral peniano.

As células intermediárias, comparadas as basais, apresentaram núcleo e matriz citoplasmática claros, constituída pelas mesmas organelas, acrescida de retículo endoplasmático na forma de lamelas concêntricas, de complexo de Golgi e de pequenas gotas de lipídio. FIRTH & HICKS (1973) em estudo sobre a variação da ultra-estrutura e

citoquímica das enzimas do epitélio de transição dos mamíferos, relatam dificuldades para interpretar a diversidade estrutural entre as células intermediárias de diferentes espécies estudadas. As células intermediárias do epitélio de transição apresentam lamelas concêntricas, relatadas primeiramente no epitélio de camundongos (WALKER, 1960). NICKERSON & CURTIS (1969) sugerem que as lamelas constituam sítios de reunião de novos retículos endoplasmáticos rugosos. Espaços intercelulares foram observados com mais frequência entre as células intermediárias e basais do epitélio uretral, sendo similares àqueles encontrados no epitélio de transição da bexiga urinária (MONIS & ZAMBRANO, 1968). Interdigitações e desmosomas observados entre as células basais, intermediárias superficiais da uretra peniana, segundo VERLANDER (1998), promovem estabilidade e elasticidade ao epitélio que sofre alterações frequentes devido às mudanças da luz.

As células superficiais mostraram-se similares às intermediárias, porém sua superfície apical apresentou microvilos curtos.

Com relação à ocorrência do acúmulo de gotas de lipídio na matriz citoplasmática das células intermediárias e superficiais, acredita-se que seja consequência do metabolismo do etanol similar ao dos hepatócitos de alcoolistas. Segundo LIEBER (1991), a lipogênese aumentada pode ser considerada como uma forma das células hepáticas se desfazer do excesso de íons hidrogênio. A atividade do ciclo do ácido cítrico fica deprimida pelo fato da mitocôndria utilizar os equivalentes de hidrogênio, originados no metabolismo do etanol, como fonte de energia em detrimento dos derivados do metabolismo dos ácidos graxos. A diminuição da oxidação dos ácidos graxos resulta no acúmulo hepático de lipídio.

Através da ultra-estrutura, observou-se a presença de células NE uretrais nos grupos estudados. Essas células exibiram vesículas com grânulos citoplasmáticos similares aos descritos nas células NE do epitélio da próstata e da uretra prostática (DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN, 1984). A maior parte dos relatos da ultra-estrutura das células NE no sistema digestório está baseado na sua principal característica morfológica, a presença de vesículas com grânulos citoplasmáticos contendo hormônio polipeptídeo ou amina biogênica (SOLCIA *et al.*, 1975).

VITTORIA *et al.*, 1992 relatam que o colículo seminal da uretra masculina de muitos mamíferos contém grande número de células NE, cujos grânulos podem estar

envolvidos na regulação da contração da parede muscular da uretra, determinando, provavelmente, a emissão dos fluidos urogenitais (DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN, 1985; HANYU *et al.*, 1987; CECIO & VITTORIA, 1989; VITTORIA *et al.*, 1990).

Em estudo sobre a distribuição de paraneurônios do trato urinário de cães, HANYU *et al.* (1987) relataram que a maior parte dessas células contém serotonina e cromogranina. Por outro lado, VITTORIA *et al.* (1990) relataram que as células do complexo uretroprostático do carneiro exibiram dois tipos de aminas biogênicas, a serotonina e a somatostatina.

No intestino, a musculatura lisa é o principal alvo da serotonina, estimulando sua contração (FURNES & COSTA, 1982). Tal função é considerada importante no início dos movimentos peristálticos (GONELLA, 1981). Por analogia, no trato urogenital, a serotonina pode induzir a contração da musculatura lisa e a conseqüente expulsão de sêmen ou urina (DI SANT'AGNESE & DE MESY JENSEN, 1985; HANYU *et al.*, 1987). HANYU *et al.* (1987) demonstraram que a injeção dessa amina na artéria ilíaca do cão causa a contração do músculo liso da bexiga urinária e da uretra. Outra função da serotonina no trato gastroenteropancreático é a estimulação de secreção exócrina (FURNES & COSTA, 1982).

O significado funcional das células neuroendócrinas no epitélio uretral permanece desconhecido. Outra característica peculiar a esse tipo celular é a constante associação com fibras nervosas aferentes e eferentes. De acordo com LEVER *et al.* (1959), as células NE podem receber impulsos de nervos aferentes localizados próximos à membrana basal do epitélio uretral. DIXON *et al.* (1973) concluíram que axônios epiteliais, associados às células neuroendócrinas, são provavelmente sensores naturais da regulação neurosecretores.

Na literatura científica especializada, há estudos experimentais relacionando o alcoolismo crônico com o decréscimo no peso corpóreo e nos índices organo-somáticos dos órgãos de animais controle e tratados com etanol (KLASSEN & PERSAUD, 1978; SALONEN & HUHTANIEMI, 1990; CAGNON *et al.*, 1996). Os resultados do presente trabalho demonstram que os pesos médios corpóreo e testicular do grupo UChB foram menores. O peso médio do conjunto vesícula seminal e glândula de coagulação foi menor

no grupo UChA. Os índices T/PC e VS+GC/PC seguem o padrão de avaliação dos grupos estudados descritos para as variáveis. Quanto à dosagem de testosterona plasmática, não houve diferença significativa. No entanto, observou-se uma tendência no aumento de testosterona nos grupos estudados, sendo que o grupo UChB apresentou a maior concentração, seguido pelos grupos UChA e controle. De acordo com esses dados, verificou-se que a tendência no aumento de testosterona entre os grupos estudados é diretamente proporcional ao aumento observado para o peso do conjunto vesícula seminal e glândula de coagulação. Sugere-se que esse aumento de peso esteja relacionado com a dependência de andrógenos. Segundo KLASSEN & PERSUD (1978), a ingestão crônica de etanol diminui significativamente os níveis plasmáticos de testosterona. O declínio da testosterona deve-se ao decréscimo na taxa de produção e ao aumento da quebra e remoção de testosterona da corrente sanguínea. Numerosos estudos indicam que o uso abusivo de álcool pode causar atrofia testicular (ADLER, 1992). Segundo EMANUELE & EMANUELE (1998), a atrofia testicular associada à queda dos níveis plasmáticos de testosterona pode resultar em impotência, infertilidade e redução dos caracteres sexuais secundários. A atrofia testicular é comum entre os alcoólicos, ocorrendo em 75% dos homens com cirrose avançada (LLOYD & WILLIAMS, 1948). Segundo esses autores, os efeitos do álcool sobre o eixo hipotálamo-hipófise-testículo-adrenal podem ser a causa da atrofia testicular. O álcool atuaria na conversão de testosterona a estrógeno através do processo de aromatização. Estudos experimentais com animais indicam que o álcool não aumenta diretamente a produção de testosterona pelos testículos. Por outro lado, a aromatização da testosterona e da androstenediona a estrógenos ocorreria em outros tecidos, como o fígado e o tecido adiposo (GORDON *et al.*, 1978). Nesses tecidos, o álcool estimula a enzima aromatase a mediar a reação de aromatização (GORDON *et al.*, 1979). Alguns autores sugerem que o acetaldeído, um dos produtos do metabolismo do álcool, possa ser também um fator de contribuição para a supressão de testosterona, pois alguns estudos revelaram que o acetaldeído foi mais potente que o álcool na supressão na produção de testosterona (BADR *et al.*, 1977; COBB *et al.*, 1978). Acredita-se que a enzima que medeia a quebra de álcool, a acetaldeído, use certas moléculas, isto é, co-fatores também requeridos por enzimas envolvidas na produção de testosterona (ELLINGBOE &

VARANELLI, 1979; GORDON *et al.*, 1980). Diante desses resultados, sugere-se que tais alterações nos testículos não estejam diretamente relacionadas à testosterona plasmática circulante.

QUINTANILLA & TAMPIER (2003) relataram para a linhagem UChA consumo médio de etanol entre 0,1-2g/Kg/dia e para a UChB entre 4-7g/Kg/dia. No presente estudo, a linhagem UChA apresentou consumo médio de etanol de 5,9g/Kg/dia e a UChB de 7,2g/Kg/dia. Nota-se que os ratos das linhagens UChA e UChB utilizados nesse experimento conservaram a característica selecionada para o consumo de etanol. No entanto, verificou-se que a quantidade de solução de etanol ingerida é maior do que os últimos registros literários, especialmente na linhagem UChA. Acredita-se que tal comportamento deve-se às influências ambientais à que esses animais foram submetidos.

Conclusões

- O consumo crônico de etanol induz alterações morfológicas e fisiológicas no epitélio da uretra peniana de ratos UCh;
- O etanol provoca atrofia testicular e alterações na concentração de testosterona plasmática;
- As células NE uretrais dos ratos controle e UCh são similares ultra-estruturalmente aos outros tipos celulares do sistema APUD;
- Os ratos UCh apresentam adaptações à ingestão crônica de etanol.

Referências Bibliográficas

- ADLER, R.A. Clinically important effects of alcohol on endocrine function. **Journal of Clinical of Endocrinology and Metabolism**, v.74, p.957-60, 1992.
- APRIKIAN, A.G.; HAN, K.; GUY, L.; LANDRY, F.; BEGIN, L.R.; CHEVALIER, S. Neuroendocrine differentiation and the bombesina/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. **The Prostate, Supplement** v.8, p.52-61, 1998.
- AUMÜLLER, G.; LEONHARDT, M.; JANSSEN, M.; KONRAD, L.; BJARTELL, A.; ABRAHAMSSON, P.A. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. **Urology**, v.53(5), p.1041-8, 1999.
- BADR, F.R.; BARTKE, A.; DALTERIO, S.; BULGER, W. Suppression of testosterone production by ethyl alcohol: Possible mode of action. **Steroids**, v.30, p.647-55, 1977.
- CAGNON, V.H.A., GARCIA, P.J., MARTINEZ, F.E., MARTINEZ, M; PADOVANI, C.R. Ultrastructural study of the coagulating gland of the wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. **The Prostate**, v.28, p.341-6, 1996.
- CECCIO, A. & VITTORIA, A. Urogenital paraneurons in several mammals. **Arch. Histol. Cytol.**, v.52 (Suppl.), p.403-13, 1989.
- CHEVALIER, S.; BLEAU, G.; ROBERTS, K.D.; CHAPDELAINE, A. Proliferation and differentiation of canine prostatic epithelial cells in culture. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.24, p.195-208, 1981.
- COBB, C.F.; ENNIS, M.F.; van THIEL, D.H.; GAVALER, J.S.; LESTER, R. Acetaldehyde and ethanol are direct testicular toxins. **Surgical Forum**, v.29, 87-102, 1978.
- DEANE, H.W. & WURZELMANN, S. Electron microscopic observations on the postnatal differentiation on the seminal vesicle epithelium of the laboratory mouse. **Am. J. Anat.**, v.117, p.91-134, 1965.
- DE LIMA, J.M.B. Da necessidade de uma nova abordagem – Parte II. **Rev. Bras. Neurol.**, v.33, p.171-2, 1997.
- DERMER G.B. Basal cell proliferation in benign prostatic hyperplasia. **Cancer**, v.41, p.1857-62, 1978.

- DI SANT'AGNESE, P.A. & DE MESNY JENSEN, K.L. Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra. An ultrastructural study. **Human Pathol.**, v.15, p.1034-41, 1984.
- DI SANT'AGNESE, P.A. & DE MESNY JENSEN, K.L. Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells: distribution; analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains. **Arch. Path. Lab. Med.**, v.109, p.607, 1985.
- DI SANT'AGNESE, P.A. Divergent neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v.17 (2), p.149-61, 2000.
- DIXON, J.S.; GOSLING, J.A.; RAMSDALE, D.R. Urethral chromaffin cells. **Z. Zellforsch.**, v.138, p.397-406, 1973.
- ELLINGBOE, M.A. & VARANELLI, C.C. Ethanol inhibits testosterone biosynthesis by direct action on Leydig cells. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v.24, p.87-102, 1979.
- EMANUELE, M.A.; EMANUELE, N. Alcohol's effects on male reproduction. **Alcohol Health & Research World**, v.22 (3), p.195-201, 1998.
- FIRTH, J.A.; HICKS, R.M. Interspecies variation in the fine structure and enzyme cytochemistry of mammalian transitional epithelium. **J. Anat.**, v.116, p.31-43, 1973.
- FURNES, J.B.; COSTA, M. Identification of gastrointestinal neurotransmitters, In: **HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY**, Berlin: Springer, 1982, p.383-462.
- GOMES, I.C.; CAGNON, V.H.A.; CARVALHO, C.A.F.; DE LUCA, I.M.S. Sterology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. **Tissue & Cell**, v.34(3), 177-86, 2002.
- GONELLA, J. The physiological role of peripheral serotonergic neurons. A review. **J. Physiol.**, v.77, 515-19, 1981.
- GORDON, G.S.; SOUTHERN, A.L.; LIEBER, C.S. The effects of alcoholic liver disease and alcohol ingestion on sex hormone levels. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.2, p.259-63, 1978.

- GORDON, G.S.; SOUTHREN, A.L.; VITTEK, J.; LIEBER, C.S. The effects of alcohol ingestion on hepatic aromatase activity and plasma steroid hormones in the rat. **Metabolism**, v.28, p.20-4, 1979.
- GORDON, G.S.; SOUTHREN, A.L.; VITTEK, J.; MUNNANGI, P.; LIEBER, C.S. Effect of chronic ethanol ingestion on the biosynthesis of steroids in rat testicular homogenate in vitro. **Endocrinology**, v.106, p.1880-5, 1980.
- GRIMELIUS L. A silver nitrate stain for alpha 2 cells in human pancreatic islets. **Acta Societa Medica Uppsala**, v.73, p.243, 1968.
- HAKKY, S. J. Ultrastructure of the normal urethra. **Br. J. Urol.**, v.51, p.304-7, 1979.
- HANYU, S.T.; IWANAGA, K.; FUJITA, T. Distribution of serotonin-immunoreactive cells in the lower urinary tract of dogs. **Am. J. Anatomy**, v. 180, p.349-56, 1987.
- HAYES, K.J. The so-called levator ani of the rat. **Acta Endocrinol.**, v.48, p.337-47, 1965.
- HAZEM, R.; ISMAIL, A.; LANDRY, F.; APRIKIAN, A.G.; CHEVALIER, S. Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. **The Prostate**, v.51, p.117-25, 2002.
- HEBEL, R.; STROMBERG, M.W. **Anatomy of the laboratory rat**. Baltimore: William & Wilkins, 1976. 173p.
- HUMMEL, K.P.; RICHARDSON, F.L.; FEKETE, E. Anatomy. In: GREEN, E. L. (Ed.). **Biology of the laboratory mouse**. 2.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1966. p.247-307.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 3rd ed., Prentice-Hall: New Jersey, 1992. 642p.
- KLASSEN, R.W. & PERSAUD, T.V.N. Influence of alcohol on the reproductive system of the male rat. **Int. J. Fertil.**, v.23 (3), p.176-84, 1978.
- LEVER, J.D.; LEWIS, P.R. BOYD, J.D. Observations on the fine structure and histochemistry of the carotid body in the cat and rabbit. **J. Anatomy**, v.93, p.478-90, 1959.

- LIEBER, C.S. & DE CARLI, L.M. Hepatotoxicity of ethanol. **J. Hepathol.**, v.12, p.394-401, 1991.
- LLOYD, C.W. & WILLIAMS, R.H. Endocrine changes associated with Laennec's cirrhosis. **Annals of the American Journal of Medicine**, v.43, p.315-30, 1948.
- MAHER, J.J. Exploring alcohol's effects on liver function. **Alcohol Health & Research World**, v.21 (1), p. 5-12, 1997.
- MONIS, M., ZAMBRANO, D. Ultrastructure of the transitional epithelium of men. **Zeitschrift Zellforschung. Mikrosk. Anat.**, v. 87, p. 101-7, 1968.
- NICKERSON, P.A.; CURTIS, J.C. Concentric whorls of rough endoplasmic reticulum in adrenocortical cells of the Mongolian gerbil. **J. Cell. Biol.**, v. 40, p.859-62, 1969.
- PEARSE, A.G.E. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells (The APUD series) and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. **J. Histochem. Cytochem.**, v.17, p. 303-13, 1969.
- PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; SEGATELLI, T.M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R. & MARTINEZ, F.E. Structure of the pelvic and penile urethra—relationship with the ducts of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J. Anatomy**, v.202, p.431-44, 2003a.
- PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; SEGATELLI, T.M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R. & MARTINEZ F.E. Ultrastructure of the urethra of the Mongolian gerbil. **World Journal of Urology**, v.20, p.378-84, 2003b.
- PRETL, K. Zur frage der endokrinie der menschlichen vorsteherdruse. **Virch. Arch. Path. Anat.**, v.312, p.392, 1944.
- QUAYLE, A.J.; PUDNEY, J.; MUÑOZ, D.E.; ANDERSON, D.J. Characterization of the T lymphocytes and antigen-presenting cells in the murine male urethra. **Biol. Reprod.**, v.51, p.809-20, 1994.
- QUINTANILLA, M.E. & TAMPIER, L. Acetaldehyde-reinforcing effects: differences in low-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. **Alcohol**, v.31, p.63-9, 2003.

- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v.171, p.65-72, 1963.
- SALONEN, I.; HUHTANIEMI, I. Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat. **Biol. Reprod.**, v.42 (1), p. 55-62, 1990.
- SOLCIA, E.; CAPELLA, C.; VASSALLO, G. Endocrine cells in the gastric mucosa. **Int. Rev. Cytol.**, v.42, p.223, 1975.
- SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Research & Health**, v.24 (2), p.124-31, 2000.
- TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L. Animal models in alcohol research. **Alcohol Research & Health**, v.24 (2), p.77-84, 2000.
- VERLANDER, J.W. Normal ultrastructure of the kidney and lower urinary tract. **Toxicol. Pathol.**, v.26, p.1-17, 1998.
- VITTORIA, A.; COCCA, T.; LA MURA, E.; CECIO, A. Immunocytochemistry of paraneurons in the female urethra of the horse, cattle, sheep, and pig. **The Anatomical Record**, v.233, p.18-24, 1992.
- VITTORIA, A.; LA MURA, E.; COCCA, T.; CECIO, A. Serotonin -, somatostatin – and chromogranin A – containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. **J. Anat.**, v.171, p.169-78, 1990.
- WALKER, B.E. Electron microscopic observations on transitional epithelium of the mouse urinary bladder. **J. Ultrastruct. Res.**, v.3, p.345-61, 1960.
- WATSON, M. L. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.4, p.727-30, 1958.
- XUE, Y.; SONKE, G.; SCHOOTS, C.; SCHALKEN, J.; VERHOFSTAD, A.; DE LA ROSETTE, J.; SMEDTS, F. Proliferative activity and branching morphogenesis in the human prostate: A closer look at pre- and postnatal prostate growth. **The Prostate**, v.49, 132-9, 2001.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4rd ed., Prentice-Hall: New Jersey, 1996. 663p.

Conclusões Gerais

- O consumo crônico de etanol induz alterações morfológicas e fisiológicas no epitélio da uretra de ratos UCh;
- O etanol provoca atrofia testicular e alterações na concentração de testosterona plasmática;
- As células NE uretrais dos ratos controle e UCh são similares, quanto a imunohistoquímica e a ultra-estrutura, aos outros tipos celulares do sistema APUD;
- A associação estrutural existente entre o epitélio uretral e as fibras nervosas aferentes influencia as células NE e os outros tipos celulares do epitélio uretral através de ação parácrina;
- Os ratos UCh apresentam adaptações à ingestão crônica de etanol.

Referências Bibliográficas Gerais

- AZZOPARDI, J.G.; EVANS, D.J. Argentaffin cells in prostatic carcinoma: differentiation from lipofuchisin and melanin in prostatic epithelium. **J. Pathol.**, v.104, p.247, 1971.
- CAGNON, V.H.A.; TOMAZINI, F.M.; GARCIA, P.J.; MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M. & PADOVANI, C.R. Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57Bl/6J) submitted to chronic alcohol ingeston. **Tissue & Cell**, v.33 (4), p.354-360, 2001.
- CLAIR, H.R.St. **Recognizing alcoholism and its effects: a mine-guide**. Basel: S. Karger, 1991, 105p.
- DI SANT'AGNESE, P.A. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. An uptade on recent developments. **Annals of Oncology**, v.12, p.S135-40, 2001.
- DI SANT'AGNESE, P.A. & COCKETT, A.T.K. The prostatic endocrine-paracrine (Neuroendocrine) regulatory system and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review and future directions in basic research. **The Journal of Urology**, v.152, p.1927-31, 1994.
- DI SANT'AGNESE, P.A.; DAVIS, N.S.; CHEN, M.; DE MESNY JENSEN, K.L. Age-related changes in the neuroendocrine (endocrine-paracrine) cell population and the serotonin content of the guinea pig prostate. **Laboratory Investigation**, v.57, p.729-36, 1987.
- DI SANT'AGNESE, P.A., DE MESNY JENSEN, K.L. Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra. An ultrastructural study. **Human Pathol.**, v.15, p.1034-41, 1984.
- DI SANT'AGNESE, P.A. & DE MESNY JENSEN, K.L. Myeloid bodies in endocrine-paracrine (neuroendocrine, APUD) cells: of the prostatourethral region. **J. Submicrosc. Cytol. Path.**, v.21, p.557, 1989.
- DRIVER, H.E.; SWANN, P.F. Alcohol and human cancer (review). **Anticancer Research**, v.7, p.309-20, 1987.
- EMANUELE, M.A.; EMANUELE, N. Alcohol's effects on male reproduction. **Alcohol Health & Research World**, v.22 (3), p.195-201, 1998.
- FEYTER, F. Über Diffuse Endocrine Epithelial Organe. **Lepzig: J. A. Barth**, 1938.

- FORTES, J.R.A.; CARDO, W. N. **Alcoolismo**. São Paulo, Sarvier, 1991.
- FURNES, J.B.; COSTA, M. Identification of gastrointestinal neurotransmitters, In: **HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY**, Berlin: Springer, 1982, p.383-462.
- GAYOTTO, L.C.C. & ALVES V.A.F. **DOENÇAS DO FÍGADO E VIAS BILIARES**. São Paulo: Atheneu, 2001. v. 2. p. 674-80.
- JENSEN, O.M. Cancer morbidity and causes of death among Danish brewery works. **Int. J. Cancer**, v.23, p.454-63, 1979.
- KITSON, K.E. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present, and future (symposium). Regulation of the ethanol metabolism. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.20 (82), p.A92A, 1996.
- KLASSEN, R.W. & PERSAUD, T.V.N. Influence of alcohol on the reproductive system of the male rat. **Int. J. Fertil.**, v.23 (3), p.176-84, 1978.
- LI, T.K.; LUMENG, L.; McBRIDE, W.J. *et al.* Rodent lines selected for factors affecting alcohol solution. **Alcohol Alcohol. Suppl.**, v.1, p. 91-6, 1987.
- LIEBER, C.S. & DE CARLI, L.M. Hepatotoxicity of ethanol. **J. Hepathol.**, v.12, p.394-401, 1991.
- LIEBER, C.S. Biochemical factors in alcoholic liver disease. **Sem. Liver Dis.**, v.13, p.136-53, 1993.
- McCLEARN, E.& RODGERS, D.A. Genetic factors in alcohol preference of laboratory mice. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.54, p.116-9, 1961.
- MAHER, J.J. Exploring alcohol's effects on liver function. **Alcohol Health & Research World**, v.21 (1), p. 5-12, 1997.
- MARDONES, J. Es la predisposición genética al alcoholismo una perturbación del mecanismo de la saciedad de alcohol? **El Pensamiento de los Premios Nacionales de Ciencia**, p.19-34, 1993.
- MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J.; PADOVANI, C.R.; V.H.A., CAGNON & MARTINEZ, M. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. **The Prostate**, v.22, p.317-24, 1993.

- MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J.; PADOVANI, C.R.; V.H.A., CAGNON; MARTINEZ, M. A morphometric ultrastructural study of the seminal vesicle of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.29, p.537-42, 1997.
- MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M; PADOVANI, C.R.; BUSTOS-OBREGÓN Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.32, p.175-84, 2000.
- MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M; QUITETE, V.H.A.C.; JÚNIOR, W.M. & PADOVANI, C.R. Alcoolismo, Reprodução e Genética. **Veterinária Notícias**, v.8 (2), p.121-30, 2002.
- MINCIS, M. Fígado e Álcool, In: GAYOTTO, L.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares**. Atheneu: São Paulo, 2001.
- MINCIS, M., BAROLLO, C.R., FILHO, B.H., SAAD, F.A. Alterações hepáticas e pancreáticas em alcoólatras crônicos. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v.19, p.365-70, 1973.
- NETO, M.R.L. Saúde Mental. São Paulo. Psiquiatria e Psicanálise on line, 2003. Apresenta textos sobre saúde mental. Disponível em: <http://www.mentalhealth.med.br>. Acesso em: 10 dez. 2003.
- NOVELLI, E.L.B.; RODRIGUES, N.L.; SANTOS, C.X.C.; MARTINEZ, F.E.; NOVELLI, J.L.V.B. Toxic Effects of Alcohol Intake on Prostate of Rats. **The Prostate**, v. 31 (1), p.37-41, 1997.
- PALMER, T.N. The biochemistry of alcohol and alcohol abuse. **Sci. Prog.**, v.73, p.1-15, 1989.
- PEARSE, A.G.E. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells (The APUD series) and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. **J. Histochem. Cytochem.**, v.17, p. 303-13, 1969.
- PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; SEGATELLI, T.M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R. & MARTINEZ F.E. Ultrastructure of the urethra of the Mongolian gerbil. **World Journal of Urology**, v.20, p.378-84, 2003.

- POLLICE, L., RESTA, L., GIOVANNI, S. APUD cells in normal and hiperplastic prostates. **Rec. Clin. Lab.**, v. 9, p. 273, 1979.
- PRETL, K. Zur frage der endokrinie der menschichen vorsteherdruse. **Virch. Arch. Path. Anat.**, v.312, p.392, 1944.
- RAMSDALE, D. R. Further observations on urethral chromaffin cells. **Cell Tissue. Res.**, v.148, p.499, 1974.
- REICHLIN, S. Somatostatin I. **N. Engl. J. Med.**, v. 309, p. 1495-501, 1983a.
- REICHLIN, S. Somatostatin II. **New Engl. J. Med.**, v. 309, p.1556-63, 1983b.
- SOLCIA, E.; CAPELLA, C.; VASSALLO, G. Endocrine cells in the gastric mucosa. **Int. Rev. Cytol.**, v.42, p.223, 1975.
- SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Research & Health**, v.24 (2), p.124-31, 2000.
- van DIJK, B.A.C.; VAN HOUWELINGEN, K.P.; WITJES, J.A.; SCHALKEN, J.A.; KIEMENEY, L.A..L.M. Alcohol dehydrogenase type 3 (ADH3) and the risk of bladder cancer. **European Urology**, v.40, p.509-14, 2001.
- VITTORIA, A.; LA MURA, E.; COCCA, T.; CECIO, A. Serotonin -, somatostatin – and chromagranin A – containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. **J. Anat.**, v.171, p.169-78, 1990.