

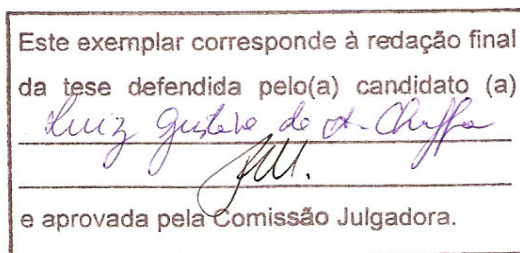
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA

**“ESTRUTURA E BIOMETRIA DOS OVÁRIOS
DE RATAS ADULTAS UChA E UChB
(CONSUMIDORAS VOLUNTÁRIAS DE ETANOL)”**



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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

Campinas, 2008

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

C471e

Chuffa, Luiz Gustavo de Almeida

Estrutura e biometria dos ovários de ratas adultas UChA e UChB (consumidoras voluntárias de etanol) / Luiz Gustavo de Almeida Chuffa. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Francisco Eduardo Martinez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ciclo estral. 2. Ovários. 3. Ultraestrutura (Biologia). 4. Álcool. 5. Rato. I. Martinez, Francisco Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Structure and biometry of UChA and UChB adult rats'ovary (ethanol voluntary intake).

Palavras-chave em inglês: Estrous cycle; Ovaries; Ultrastructure (Biology); Alcohol; Rats.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Francisco Eduardo Martinez, Maíra Aparecida Stefanini, Isabel Cristina Cherici Camargo.

Data da defesa: 26/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

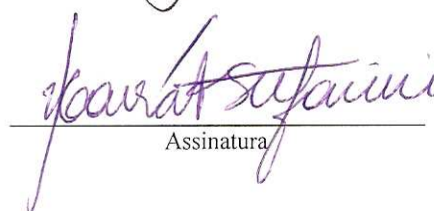
Campinas, 26 de Fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Máira Aparecida Stefanini


Assinatura

Profa. Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo


Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete


Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano


Assinatura

*"BOM MESMO É IR À LUTA COM DETERMINAÇÃO, ABRAÇAR A VIDA
E VIVER COM PAIXÃO,
PERDER COM CLASSE E VENCER COM OUSADIA, POIS O TRIUNFO
PERTENCE A QUEM SE ATREVE...
E A VIDA É MUITO PARA SER INSIGNIFICANTE"*

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

À minha família, por tudo o que apostaram e confiaram comigo, e pela dedicação plena, pois esses sim seguem em mim e com minha longa jornada de vida.

Ao meu grandioso herói de ontem, hoje e sempre que conduz meus passos e faz deles motivo para continuar Com orgulho.....MEU PAI (*In memorian*).

E a toda minha fé e amor, em tudo, com tudo e por tudo...

AGRADECIMENTOS

“A Deus, por permitir a vida e com ela o surgimento de cada experiência e escolha”.

“A minha Família, símbolo de união, força, generosidade, AMOR....sempre”.

“À Vânia (Lô), com admiração de seu jeito delicado e doce sorriso que muito me inspiram”.

“À minha família em geral, por abraçar minha dor e quando já não é mais dor”.

“Ao Meu orientador Prof. Dr. Francisco, por confiar na minha vontade de crescer e oportunidade de mostrar algo científico, além da consideração e amizade firmadas”.

“A CAPES, pelo apoio fornecido sob a forma de bolsa científica, subsidiando toda a pesquisa aqui presente”.

“Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP e seu Corpo Docente, com excelente nível intelectual e contribuição para a formação de futuros mestres e doutores no país”.

“À Secretária que veste a camisa do Programa acima citado, Lílíam A.S. Panagio, por sua total atenção, preocupação e disponibilidade em nos ajudar quando necessário”.

“Aos Professores que aceitaram compor minha banca de qualificação, Dr. Edson Rosa Pimentel (em especial por instigar minha força e luta, quando achava que já não daria mais conta por motivo do adoecimento de meu pai), Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel, e Dra. Luciana Bolsoni, por todas as sugestões em aula e conselhos prestados”.

“Ao técnico do laboratório, Meu grande amigo e companheiro que considero muito, o PERIGOSO Gelson Rodrigues, por compartilhar de momentos bons e ruins na rotina de laboratório, sempre com ar e semblante lúdico (Um verdadeiro brincalhão!)”.

“Ao Grupo de pesquisa do Departamento de Anatomia da UNESP de Botucatu e a seus Funcionários, em especial a Prof. Dra. Patrícia (Paty), a Prof. Dra. Raquel (Raquelzinha), o Prof. Dr. Sérgio (Sérgião) e o Prof. Dr. Wilson, pela recepção, troca de informações, grandes auxílios no laboratório e amizade”.

“Às Secretárias do Departamento de Anatomia, Dona Cleusa, Geruza e Jaque, pela ajuda fornecida e disposição desde o primeiro dia em que cheguei neste departamento”.

“Aos amigos do Laboratório que passaram vários momentos ao meu lado e que algum dia experienciaram as mesmas coisas que eu: Rafael (Rafa), Giovana (Gio), Fabiana (Flor, Perigosa), Otávio, Mydian (Mi), Beatriz (Bia), Carol (Badapia), João (Fanfarrão), Henrique (Ku), Bárbara (Ba) valeu a companhia, seja por tudo que passamos ou superamos, e que nossos objetivos nunca sejam abandonados”.

“Ao Wanderlei Thiago da Silva, por sua dedicação ao Biotério do departamento de Anatomia, cooperando com manutenção, reprodução das matrizes, criação e seleção das linhagens bebedoras voluntárias de etanol.

“Aos bioteristas da parasitologia por conceder espaço para alojar grupos de animais na segunda fase do experimento, e pelo tratamento de elevado nível, cuidado e prazer na profissão que exercem”.

“A Banca Examinadora deste trabalho, por sugestões fundamentais na elaboração final desta dissertação”.

“Aos meus grandes e insubstituíveis amigos....aaah!..... guardarei-os para sempre, em segredo, para ninguém os roubar de mim. Gostaria de discriminá-los; aos que conheci e convivi intensamente durante meu mestrado, presto homenagem ao Departamento de Morfologia como um todo em vista de tudo o que me foi fornecido, em especial a Glaura (Glenda), pela classe e virtude em integrar pessoas; Davi (Fera, brincalhão, caixa) que considero muito, uma vez que aprendemos e dividimos muitas coisas juntas desde o início da graduação e que por motivo outro está nos deixando em saudades; Os Cururus (família grande de amigos em que se misturam um pouco de risos, histórias, companheirismo, saudade, choro, e em meio a tudo isso, muito aprendizado) Valeu irmãos!; aos velhos e bons amigos da faculdade guardo as boas lembranças no coração”.

“Aos amigos e colegas, que fizeram ou ainda fazem parte da minha vida, da minha trajetória, pois tudo que aprendo fica para sempre na memória....e lá se vão os anos.....nunca cairão em esquecimento”.

“A todos aqueles que de alguma forma, com um simples gesto, contribuíram para eu estar aqui, não citarei nomes, mas sim o que posso deixar expressando minha gratidão é o..... Meu muito obrigado!!”.

“A tudo e a todos, meu muitíssimo obrigado!”

*“Erros são, no final das contas,
fundamentos de verdade. Se um homem
não sabe o que uma coisa é, já é um
avanço do conhecimento saber o que ela
não é”*

Carl Jung

*“É preciso a certeza de que tudo vai mudar;
É necessário abrir os olhos e perceber que as
coisas boas estão dentro de nós: onde os
sentimentos não precisam de motivos nem os
desejos de razão. O importante é aproveitar
o momento e aprender sua duração; Pois a
vida está nos olhos de quem sabe ver...Se não
houve frutos, valeu a beleza das flores. Se
não houve flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houve folhas, valeu a intenção da
semente”*

Henfil

SUMÁRIO

Resumo.....	01
Abstract.....	02
Introdução Geral.....	03
Revisão da Literatura.....	04
Álcool: Toxicidade e Farmacocinética.....	04
Seleção das linhagens bebedoras de etanol.....	07
Álcool e o Sistema Reprodutor Feminino.....	09
Ovário: Estrutura e Funcionamento.....	12
Justificativa e Relevância da Temática.....	14
Objetivo.....	14
Artigos.....	14
Artigo 1.....	15
Conclusões Finais.....	69
Referências Bibliográficas.....	70

RESUMO

O alcoolismo crônico está inserido no grupo das principais doenças classificadas como oriundas de distúrbios mentais, sendo as mulheres mais atingidas em relação aos homens. Embora, o álcool conduza inicialmente a estímulos emocionais benéficos para o organismo, proporcionando aumento da euforia, do prazer, entre outros, seu uso excessivo e prolongado pode promover efeitos colaterais indesejáveis, inclusive sobre a reprodução. Na literatura existem poucos estudos envolvendo as consequências do alcoolismo crônico em fêmeas. O presente trabalho tem como objetivo elucidar as alterações manifestadas no ovário de ratas adultas UChA e UChB (consumidoras voluntárias de etanol a 10%). Após o período de tratamento, 42 ratas subdivididas em três grupos experimentais (UChA, UChB e Wistar) foram eutanasiadas por decapitação, e os ovários coletados e processados para análise em microscopia de luz e eletrônica de transmissão. O material foi corado com Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson, Azul de Toluidina, ácido periódico de Schiff, Giemsa, Feulgen e, empregou-se o método enzimológico para atividade da fosfatase ácida e alcalina. Os parâmetros: peso corpóreo e dos genitais, índice de ganho de peso, duração dos ciclos estrais e dosagens hormonais (FSH, LH, β -estradiol e progesterona) foram avaliados. A análise estatística foi realizada com 5% de significância. Não houve diferença significativa entre o peso dos animais no início e final do experimento, embora, ao final do experimento, os animais do grupo UChB apresentaram maior índice de ganho de massa. O peso relativo dos ovários dos animais UChB mostrou-se significativamente menor comparado ao grupo Wistar. As dosagens hormonais não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Os animais UChA e UChB revelaram as maiores médias de duração dos ciclos estrais e permanência na fase de estro. Nota-se estágios diferenciados de proliferação celular e atresia folicular avançada nos ovários, variando entre os grupos UChA e UChB. Nas variedades bebedoras, a túnica albugínea apresentou-se fibrosa e o estroma medular predominantemente celular. Estroma fibrocelular e túnica albugínea fibrosa estão presente no grupo controle. O grupo UChA apresentou reações metacromáticas entre as células da granulosa dos folículos em crescimento, enquanto regiões delimitadas na parede dos folículos primários, em desenvolvimento e antrais apresentaram intensa metacromasia nos animais UChB. Os grupos UChA e UChB apresentaram reações PAS-positivo no tecido glandular intersticial, enquanto nos animais controles essas reações ficaram restritas na zona pelúcida de ovócitos e entre as células da granulosa de folículos secundários. Os folículos antrais do grupo UChB apresentaram forte reação à fosfatase ácida (FA), comparados aos grupos UChA e controle. Nos animais UChA, os corpos lúteos hemorrágicos e em regressão, destacaram reação à FA com presença de grumos associados. A fosfatase alcalina (FAL) demarcou ampla vascularização nos corpos lúteos dos animais UCh, enquanto que a teca interna dos folículos secundários do grupo UChB reagiram intensamente com a FAL. A análise ultra-estrutural revelou corpos lúteos com vacúolos autofágicos no citoplasma e início de picnose nuclear nas linhagens UCh. As células da granulosa apresentaram núcleos com marginalização da cromatina e mitocôndrias edemaciadas. Conclui-se que há irregularidades do ciclo estral e, conseqüentemente, alterações estruturais nos ovários das linhagens UChA e UChB.

Palavras-chave: ciclo estral, ovário, ultraestrutura, etanol, UCh

ABSTRACT

Chronic alcoholism belongs to the group of diseases classified as originated from mental disturbs, being the women more affected than men. Although ethanol intake causes benefic stimulus to the organism, like increase in euphoria and pleasure, excessive and prolonged use can cause side effects, even to the reproduction. On the literature, there were few researches involving chronic alcoholism and female. In regard to the current incidence of early and late alcoholism in women, and its consequences to the reproduction, the aim of this study was to evaluate the UChA and UChB (10% ethanol voluntary intake) adult rat ovary structure. After the experimental period, 42 rats divided into three groups (UChA, UChB and Wistar control) were killed, by decapitation method, and their ovaries collected to the light and electronic microscopy analysis. Ovary slides were stained with HE, Masson's trichomic, toluidine blue, Periodic Acid Schiff and tissue was cryofrozen to further acid/alkaline phosphatase histochemical techniques. Final body weight, reproductive organs weight, body weight gain index, estrous cycle duration and hormone dosages (FSH, LH, β -oestradiol and progesterone) were analyzed. The statistical analysis was made using 5% of significance. There was no significative difference between the groups as to initial and final body weights, although the UChB rats showed an increased body mass gain at the final treatment period. The UChB ovaries relative weight was significantly lower comparing to the control. The hormonal levels did not differ among the groups. The UChA and UChB groups presented prolonged estrous cycles and persistent oestrous phases. Different stages of atresia and proliferation on follicle cells were found varying in UChA and UChB ovaries. The tunica albuginea showed fibrous tissue and cellular stromal components in ethanol drinking animals. Fibrocellular stroma and fibrous tunica albuginea were present in the control group. The UChA group showed metachromatic reaction between the growing follicles granulosa cells, whereas, in the UChB rats, intense metachromasia appeared on small, growing and antral follicles. The UCh groups presented PAS-positive reaction in the interstitial glandular tissue, while in control animals these reactions were restricted to the zona pelucida of oocytes and among granulosa cells of secondary follicles. The antral follicles of the UChB rats showed a high intensity reaction to acid phosphatase (AP), when compared to UChA and control groups. In UChA animals, the hemorrhagic and regression corpora lutea had AP reaction with the presence of associated clumps. Alkaline phosphatase (ALP) marked a hypervascularization in corpora lutea of UCh rats. In UChB strain, internal theca layers of growing follicles, reacted strongerly with ALP in contrast to UChA and control groups. The ultrastructural analysis revelated in UCh strain, corpus luteum with autofagic vacuoles and pyknotic nuclei at the initial stage. The UCh granulosa cells presented irregular nucleus with chromatin marginalization and edematous mitochondria. In conclusion, there were estral cyclicity irregularities, caused by chronic ethanol intake in the UCh groups, which were consequently reflected as morphologic alterations in the ovaries structure.

Key-words: estrous cyclicity, ovary, ultrastructure, alcohol, UCh

INTRODUÇÃO GERAL

O alcoolismo presente na sociedade pode ser conceituado como um conjunto de fatores patológicos e psicológicos que podem levar ao uso excessivo e a dependência crônica (GIACHETI, 1996). Atualmente, classifica-se como o terceiro mais grave problema de Saúde Pública Mundial, ao lado da Esquizofrenia e Distúrbio bipolar (FIGUEIRA *et al.*, 1999), atingindo em maioria os homens, embora o índice de mulheres alcoólicas tem-se elevado, sofrendo os efeitos mais drásticos do álcool no organismo (FREZZA *et al.*, 1990). Por muitos anos, as intervenções farmacológicas ficaram restritas ao tratamento da Síndrome de Abstinência do Álcool, decorrentes do conjunto de sintomas físicos e psíquicos que aparecem com a diminuição ou interrupção do uso do álcool. Com o agravamento da Síndrome da Dependência do Álcool, a frequência dos sintomas aumenta, passando a se tornarem persistentes (LARANJEIRA, 1996), levando a pessoa a dar prioridade à ingestão alcoólica em detrimento das atividades sociais, profissionais ou recreativas (EDWARDS *et al.*, 1999). Recentemente, como estratégias terapêuticas, surgiram o ondansetron e o topiramato, atuando no substrato neuroquímico do sistema serotoninérgico. Em pacientes tratados com ondansetron (SWIFT *et al.*, 1996) e topiramato (JONHSON *et al.*, 2003), observou-se reduções do consumo de álcool e aumento do período de abstinência. Outros ensaios clínicos com agentes antagonistas de receptores para opióides (Naloxone e Naltrexone) têm sido avaliados com eficácia na redução dos efeitos ansiogênicos da abstinência (O' MALLEY *et al.*, 1992).

A ingestão de grandes quantidades de álcool etílico provoca alterações metabólicas e patológicas em sistemas do organismo humano, incluindo disfunções no sistema nervoso,

no metabolismo da glicose, lipídios, proteínas e alteram os aspectos nutricionais de órgãos como pâncreas, estômago e intestino (KORSTEN & LIEBER, 1979; HIRATA & HIRATA, 1991). Por induzir a formação de radicais livres, o etanol é capaz de desestabilizar proteínas e lipídios celulares (lipoperoxidação), favorecendo ao processo de apoptose/necrose e prejudicando a organogênese. Tanto o etanol quanto o acetaldeído têm efeitos diretos sobre vários fatores de crescimento celular, inibindo a síntese do ácido retinóico e a proliferação celular (RILEY *et al.*, 2001).

REVISÃO DA LITERATURA

Álcool: Toxicidade e Farmacocinética

Aproximadamente 95% do etanol presente no sangue são oxidados no fígado. Sua metabolização segue três vias diferentes nos hepatócitos: álcool desidrogenase, responsável pela maior parte do processo, sistema de oxidação microssomal e sistema da catálise binária. Após sofrer a ação da enzima álcool desidrogenase, o etanol é convertido em acetaldeído, que por sua vez, é oxidado por ação da enzima acetaldeído desidrogenase, originando como produto final o acetato intracelular, e CO₂ e H₂O na circulação para serem excretados (TAMPIER *et al.*, 1994; BASELT, 1996).

O etanol é um potente indutor de teratogênese em humanos, sendo descrito desde 1968 e conceituado como um padrão específico de malformações em 1973. Quando ingerido durante a gestação, pode levar ao neonato um quadro de Síndrome Fetal Alcoólica (HOYME *et al.*, 2005), condição irreversível, caracterizada por anomalias craniofaciais típicas, retardo no crescimento e distúrbios cerebrais (HOYME *et al.*, 2005;

KRULEWITCH, 2005). O álcool ingerido pela gestante atravessa a barreira placentária, expondo o feto às mesmas concentrações sanguíneas materna. No feto (CHAUDHURI, 2000), as consequências do etanol são maiores, pois seu metabolismo e eliminação são mais lentos, tornando o líquido amniótico impregnado de álcool não modificado (etanol) e acetaldeído (metabólito do etanol).

Estudos epidemiológicos apontam o consumo crônico de álcool como um fator predisponente para o desenvolvimento de câncer de faringe, esôfago, laringe, fígado, estômago, cólon, ovário e mama (BAGNARDI *et al.*, 2001). POSCHL & SEITZ (2004) sugerem que o álcool atue como agente co-carcinogênico ou promotor de tumor em tecidos de animais, porém não diretamente como carcinogênico. GARRO & LIEBER (1990) evidenciaram que o etanol acentua o efeito carcinogênico de outros agentes, como compostos aromáticos policíclicos e algumas nitrosaminas, favorecendo ao crescimento tumoral, diminuição da capacidade de destoxificação, imunossupressão e inibição das enzimas de reparo do DNA lesado. O consumo de álcool pode aumentar a incidência de câncer de mama, com fator de risco estimado para 7% a cada 10g de álcool ingerido diariamente (ROISMAN & LIFSHITZ, 2006). Estudos recentes apontam que parte dos efeitos carcinogênicos do consumo de etanol devem estar relacionados com três fatores: o metabolismo *in situ* de níveis de etanol citosólico e microsomal, o efeito mutagênico promovido pelo acetaldeído e por radicais hidroxil e 1-hidroxietil (LIEBER & DE CARLI, 1973). CASTRO *et al.* (2006) enfatizaram o efeito do etanol em células epiteliais de glândula mamária de ratas adultas, evidenciando alterações ultraestruturais, núcleo irregular com invaginações do envoltório nuclear, condensação da cromatina e dilatação dos poros nucleares.

A alta concentração de álcool no sangue é relatada como um dos principais fatores que desencadeiam deficiências neurológicas severas na medula espinhal (FORCHHEIMER *et al.*, 2005), morfológicas e neuropsicológicas (MOSELHY *et al.*, 2001). Entre alguns mecanismos cognitivos que são afetados pelo alcoolismo crônico e agudo, destacam-se: ausência de atenção, cognição prospectiva e falhas na memória autobiográfica. Os transtornos emocionais promovidos pelo álcool incluem: disforia, ansiedade, fobias, depressão e agressão (O'CONNELL *et al.*, 2005). Uma característica comum envolvendo o etanol, a nicotina, a cocaína, a anfetamina e os opióides, é a habilidade em ativar o sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (GRENHOFF *et al.*, 1986; CLARKE *et al.*, 1988; KOOB, 1992; BLOMQVIST *et al.*, 1993), estrutura atuante no sistema de recompensa cerebral e chave no desenvolvimento e manutenção da dependência de drogas de abuso (WISE & ROMPRE, 1989).

Alterações morfofisiológicas como impotência, atrofia testicular vinculada a atrofia de túbulos seminíferos e quantidade reduzida de células germinativas (MORRIONE, 1944; BENNETT *et al.*, 1950; VAN THIEL *et al.*, 1974), bem como ginecomastia e perda do interesse sexual em homens estão geralmente associadas com o alcoolismo (BOYDEN *et al.*, 1983). O etanol e seus metabólitos promovem inicialmente exposição, acompanhada de elevada redução dos níveis de receptores para LH em células de Leydig humanas, interferindo na síntese hormonal de testosterona (BANNISTER & LOSOWSKY, 1987; ADLER, 1992). Em ratos púberes, a síndrome da feminização induzida por queda nos níveis de testosterona, frente ao alcoolismo crônico, leva à aparente perda das funções hepáticas reguladas por receptores de andrógenos (MORGAN, 1982); sendo notável, na idade adulta, a baixa produção da 2 estrógeno hidroxilase e estrógeno sulfotransferase

(EST) (TADIC *et al.*, 2000) enzimas atuantes na metabolização de estrógenos, com concomitante aumento na atividade da P450 aromatase (GRAVES & SALHANICK, 1979). Esses efeitos podem levar a diminuição do volume seminal e subsequente quantidade de espermatozóides (PUROHIT, 2000). O álcool, quando ingerido socialmente ou em baixos níveis, não interfere diretamente com a qualidade do sêmen (MONOSKI *et al.*, 2002). Entretanto, dosagens excessivas de álcool acarretam efeitos adversos na fertilidade masculina, promovendo alterações indiretas envolvendo o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (CÍCERO, 1982; SALONEN *et al.*, 1992) ou outros sistemas que interagem com esse eixo quando estimulados pelo álcool (YEN & JAFFE, 1991), ou ainda, atuar como uma potente toxina gonadal (COBB *et al.*, 1981), a qual pode diretamente induzir apoptose local (NANJI & HILLER-STURMHOFEL, 1997) e inibir complexos enzima-substrato envolvidos na síntese esteroidogênica (ANDERSON *et al.*, 1985; CHIAO & VAN THIEL, 1983). Eventualmente, observa-se redução da inervação peniana, podendo culminar em quadro de disfunção erétil (BUFFUM, 1983).

Seleção das linhagens bebedoras de etanol

Em um trabalho de revisão de LI *et al.* (1987), se menciona a existência de três pares de linhagens de ratos de consumo baixo e elevado de álcool: os UChA e B (UCh= Universidade do Chile) os mais antigos, os de HELSINKI iniciados por KALERVO ERIKSSON e os de LUMENG & LI em Indianápolis. Existe outro em Calgari, no entanto não há muita informação a respeito. Dos três pares, os únicos que se têm mantido permanentemente mediante *inbreeding* são os UChA e B, e por conseguinte, são as únicas linhagens de ratos de que se têm conhecimento podendo ser consideradas linhagens puras

para efeitos de estudos relacionando aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos, bem como apetite e tolerância ao álcool que são importantes fatores do alcoolismo humano. As linhagens AA (*Alko Alcohol*) e ANA (*Alko Nonalcohol*) de HELSINKI foram obtidas desde o princípio por alternância de cruzamentos de *inbreeding* com *outbreeding*. Além disso, há alguns anos começou a decair a fertilidade dos cruzamentos, assim como o número de crias por ninhada, o que moveu os investigadores a recorrer ao *outbreeding*, que se tem mantido até agora. Por sua vez, 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 desde o princípio mediante *outbreeding*. É sabido que em um processo de seleção por *inbreeding* é necessário ter muita constância e paciência, pois se observa que muitos cruzamentos mostram-se inférteis, devido à probabilidade de que se produzam homozigotos letais ou subletais. Portanto, os ratos da variedade UChA e UChB, AA e ANA, embora exibam amplas diferenças na preferência ao álcool, são importantes para o estudo de características únicas ao alcoolismo humano, além da rápida reprodução, o pouco espaço físico ocupado e o baixo custo de manutenção. Por razões óbvias, os modelos animais empregados para os estudos de doenças humanas são, em geral, reproduções não exatas das doenças. Porém, a história do progresso médico ensina que eles têm sido ferramentas insubstituíveis no estudo de características particulares das doenças humanas, levando a aquisição de conhecimentos úteis no tratamento e prevenção. Atualmente, variados modelos experimentais tem surgido com a finalidade de acompanhar as características farmacológicas do etanol em cada tipo de administração e períodos de exposição, possibilitando mensurar aspectos motivacionais positivos (reforçando o

consumo) ou negativos (efeitos aversivos) (SPANAGEL & HOLTER, 2000; TABAKOFF & HOFFMAN, 2000).

Álcool e o Sistema Reprodutor Feminino

Experimentos envolvendo o alcoolismo crônico e alterações estruturais em órgãos reprodutores de fêmeas podem ajudar a enfatizar alguns dos prejuízos causados pelo uso do álcool, na qual a população pode estar sendo acometida. Restritos são os relatos que asseguram os efeitos toxicológicos de agentes químicos exógenos no organismo feminino, devido ao seu complexo ciclo hormonal reprodutivo. Aspectos relacionados à epidemiologia do câncer ovariano, envolvendo fatores reprodutivos e ambientais são bastante enfatizados na literatura especializada. Dentre os mais comuns, aparece o carcinoma epitelial ovariano (BAI *et al.*, 2000), originando-se na superfície epitelial em 90% dos casos. Já os tumores de origem germinativa e estromal são raros. Em 2002, aproximadamente 14.000 mulheres norte-americanas, diagnosticadas tardiamente chegaram à óbito (ACS, 2002). O aumento na produção de gonadotrofinas e estrógenos (SHUSHAN *et al.*, 1999) no caso de foliculogênese alterada ou fatores que mimetizam indução de ovulação (superovulação) como hCG (CELIK *et al.*, 2004) potencializam atividade mitótica epitelial (tufting), de células da granulosa folicular, e formação cística ovariana, podendo estes contínuos ciclos ovulatórios culminar em lesões neoplásicas.

Em mulheres não alcoólicas, o consumo de forma aguda parece não afetar o funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (MENDELSON *et al.*, 1981; VALIMAKI *et al.*, 1983). Já o alcoolismo crônico em mulheres, portando ou não doença do fígado, está geralmente associado a severos desarranjos funcionais reprodutivos, incluindo

quadros de amenorréia, oligomenorréia, dismenorréia, hipo ou infertilidade, abortos espontâneos (HUGUES *et al.*, 1980; HARLAP & SHIONO, 1980), perda da libido e menopausa prematura (BORHANMANESH & HAGHIGHI, 1970; GREEN & RUBIN, 1959), porém existem poucos e contraditórios dados relacionando o alcoolismo e o estado orgânico endocrinológico feminino. Alguns autores apontam o álcool como agente acentuador de hiperplasias endometriais (BARR & SOMMERS, 1957; EDMAN & MACDONALD, 1976), enquanto outros (LINQUETTE *et al.*, 1972), depressor da síntese estrogênica promovendo atrofia endometrial. Estudos realizados em mulheres alcoólicas crônicas (HUGUES *et al.*, 1980) e em macacas *Monkeys* (MELLO *et al.*, 1983) tratadas com elevadas doses de álcool (4,5 g/kg/dia) durante três meses, evidenciaram marcante amenorréia, acompanhada de oscilações de baixa produção de estrógeno e LH, atrofia endometrial e ovariana. Terapias de reposição hormonal com análogos LHRH tem se mostrado eficaz em reverter ou atenuar disfunções amenorréicas e a perimenopausa (HASHIMOTO *et al.*, 1976), porém o tratamento a longo prazo pode trazer conseqüências drásticas irreversíveis (FATHALLA, 1971; BANDERA *et al.*, 1995). Os efeitos do alcoolismo crônico no organismo feminino, interferindo na fisiologia da reprodução, podem prover de ações indiretas, no caso de disfunções hepáticas (ex. cirrose) e estresse nutricional, sendo o bom estado nutricional fator importante na manutenção do ciclo menstrual (FRISCH & MACARTHUR, 1974), e mesmo de ações do álcool no sistema nervoso ou afetando diretamente a gônada. O ovário sintetiza a enzima álcool-desidrogenase (DEANE, 1962), que atua na conversão de etanol em acetaldeído, sendo dependente da coenzima NAD para ser reduzida a NADH; por outro lado, muitos eventos da esteroidogênese ovariana, incluindo conversão de pregnenolona em progesterona pela 3-

β hidroxisteróide desidrogenase é NAD dependente (RICHARDSON, 1975), o que pode levar à disfunções mitocondriais e redução da síntese hormonal nos indivíduos alcoólicos.

A exposição contínua de ratas adultas ao etanol 5% (KRUEGER *et al.*, 1982), interfere com a ciclicidade estral, com o número de oócitos ovulados e altera períodos de abertura vaginal (BO *et al.*, 1982), porém as células descamadas do epitélio vaginal ainda apontam as características fases do ciclo. HENDERSON & SCHENKER (1977), observaram que ratas tratadas com etanol 5% durante 21 semanas, foram capazes de acasalar, fecundar e produzir proles viáveis; no entanto, os índices de perda pré ou pós-implantação não foram avaliados.

LAURA *et al.* (2003), analisando ovários de ratas tratadas com etanol (31°GL), evidenciaram aumento do número de corpos lúteos e folículos atrésicos; menor diâmetro presente nos corpos lúteos, na camada granulosa (ainda com presença de vacuolizações e gotas lipídicas) e regressão gradual da teca antral folicular. Estudo realizado em células da camada granulosa de folículos ovarianos (PUROHIT, 2000), mostrou que o aumento do consumo alcoólico parece não alterar a secreção de estradiol por estas células; porém uma maior atividade da enzima aromatase é obtida, atuando na transformação de andrógenos em estrógenos.

MAPOLES *et al.* (1994) verificaram a inibição do crescimento em células ovarianas de hamster, mantidas em cultura, e transfectadas com cDNA de hepatócitos que expressam a desidrogenase alcoólica, podendo inferir que o acetaldeído formado e não o etanol, seja o responsável pela inibição.

Na adolescência, o alcoolismo pode apresentar efeitos adversos para a reprodução feminina (LEE DEES *et al.*, 2001), incluindo: queda na produção de estradiol de forma indireta, devido alteração no balanço da produção de hormônios hipofisários, interferência na regulação do sistema do óxido-nítrico e de fatores de crescimento como (IGF-1), presentes no ovário em desenvolvimento.

Ovário: Estrutura e Funcionamento

O ovário é um órgão par revestido pelo epitélio germinativo, geralmente do tipo cúbico simples, contínuo com o mesovário. Seu interior subdivide-se em duas zonas: o córtex e a medula. O córtex contém os folículos em vários estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, células intersticiais e elementos do estroma. Por ser um tecido adaptativo, encontram-se densos agregados de fibroblastos, variando entre células do conjuntivo frouxo. Os fibroblastos são pleomórficos, podendo assumir características epitelióides, formando a teca folicular e as glândulas intersticiais associadas aos folículos (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). A região medular é formada por grandes vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, fibras elásticas, reticulares e estruturas embrionárias oriundas da *rete ovarii*.

Os ovários de ratas neonatais estão preenchidos com oócitos, apresentando-se em agrupamentos, ainda sem associação com as células da pré-granulosa (PETERS, 1969). São os fatores de transcrição e crescimento, como *Figla* e *GDF9*, sintetizados pelo oócito que auxiliam na secreção da zona pelúcida (principalmente pelas glicoproteínas ZP1, ZP2 e ZP3) e promovem a primeira interação com as células da granulosa, formando o folículo primordial (ALBERTINI *et al.*, 2001; RANKIN *et al.*, 1996). A partir daí, outros fatores

secretados pelo oócito estimulam a produção de fatores de crescimento pelas células da granulosa, mantendo seu metabolismo, crescimento, divisão e associação com as camadas tecais até o desenvolvimento folicular secundário. Após o estabelecimento dos folículos secundários, torna-se necessária a síntese e secreção de FSH pela adenohipófise. Esse hormônio glicoproteico atua estimulando a proliferação da camada granulosa, síntese de estrógenos e seus receptores, expressão de receptores para LH, P450 aromatase, activina A, inibina e atenua a morte celular programada (RICHARDS, 1994). Estrógeno, foliculostatina e inibina promovem o *feed-back* negativo na secreção de FSH pela hipófise e estimulam a liberação de LHRH pelo hipotálamo, sinalizando a síntese de LH. O hormônio LH exerce grande função na ovulação (ESPEY & RICHARDS, 2006), estimulando a produção de testosterona e androstenediona pelas células da teca interna, finaliza a meiose I no oócito, induz síntese de metaloproteinases para ruptura da parede folicular e do complexo cumulus-oócito, influencia na síntese de progesterona e seus receptores, essenciais no processo de inflamação (COX 1 - 2 e prostaglandinas), induz à luteinização e transformação das células foliculares em granulosa-luteínicas e teca-luteínicas, constituindo o corpo lúteo.

Alguns folículos em crescimento tornam-se atrésicos. Na atresia dos folículos primários e secundários, o oócito degenera antes da parede folicular, enquanto nos outros estágios ocorre o inverso. A atresia obliterativa caracteriza-se pela hipertrofia e pregueamento das camadas granulosa e teca, ocupando a cavidade antral, sendo um tipo de morte celular programada. Na atresia cística, ocorre atrofia das células granulosas e tecais, formando os cistos que em caso de não regressão, interferem no ciclo estral e na fertilidade.

Atualmente, já foram identificados nas células da granulosa e teca folicular, receptores para quase todos os hormônios e fatores existentes no organismo, incluindo o GH, TRH, CRH, LHRH, NGF1, EGF, leptina, IGF1 e 2, entre outros (BURNS & MATZUK, 2002).

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA TEMÁTICA

O consumo abusivo ou a dependência alcoólica parece estar associado a diversas alterações no ciclo reprodutivo feminino, desde a ocorrência de amenorréia ou irregularidades menstruais (BECKER *et al*, 1989), disfunções ovarianas com ciclos anovulatórios, menopausa prematura e até abortos espontâneos (KESMODEL *et al.*, 2002). Os efeitos do alcoolismo crônico sobre as estruturas reprodutivas em fêmeas são pouco enfatizados na literatura em relação às masculinas.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é analisar os efeitos da ingestão crônica do etanol sobre a estrutura e a biometria de ovários de ratas das variedades UChA e UChB, de consumo voluntário de etanol, modelos raros para os trabalhos relacionados aos efeitos do alcoolismo.

ARTIGO

O presente trabalho de Mestrado originou um artigo que foi submetido ao periódico Reproductive Toxicology, o qual se intitula “Estrutura e biometria dos ovários de ratas adultas UChA e UChB (consumidoras voluntárias de etanol)” apresentado a seguir.

ARTIGO**“ESTRUTURA E BIOMETRIA DOS OVÁRIOS DE RATAS ADULTAS UChA E UChB (CONSUMIDORAS VOLUNTÁRIAS DE ETANOL)”**

Luiz Gustavo A. Chuffa¹, Carlos R. Padovani², Francisco E. Martinez³

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

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

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

Agência Financiadora: FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Endereço do Autor:

Francisco Eduardo Martinez

Departamento de Anatomia

Instituto de Biociências de Botucatu

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Caixa-Postal 510

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

Email: martinez@ibb.unesp.br

Telephone number: +55 (14) 38116040, Fax: +55 (14) 38116264

Running title: Álcool e estrutura do ovário

ESTRUTURA E BIOMETRIA DOS OVÁRIOS DE RATAS ADULTAS UChA E UChB (CONSUMIDORAS VOLUNTÁRIAS DE ETANOL)

RESUMO

O alcoolismo crônico em fêmeas é questão atual e preocupante. O presente trabalho tem como objetivo elucidar as alterações manifestadas no ovário de ratas adultas UChA e UChB (consumidoras voluntárias de etanol a 10%). Após o período de tratamento, 42 ratas subdivididas em três grupos experimentais (UChA, UChB e Wistar) foram eutanasiadas por decapitação, e os ovários coletados e processados para análise em microscopia de luz e eletrônica. Os animais UChB apresentaram maior índice de ganho de massa corpórea e menor peso relativo dos ovários em relação aos demais grupos. As ratas UCh apresentaram as maiores médias de duração dos ciclos estrais e permanência na fase de estro. Estágios avançados de atresia folicular foram comum nos animais UCh, sendo os fragmentos celulares destacados com a técnica da fosfatase ácida e microscopia eletrônica. Conclui-se que há irregularidades do ciclo estral e, conseqüentemente, alterações estruturais nos ovários das linhagens UChA e UChB.

Palavras-chave: ciclo estral, rata, ovário, microscopia, ultraestrutura, histoquímica, etanol, UCh

INTRODUÇÃO

O alcoolismo crônico, em mulheres, favorece ao aparecimento de complicações físicas e psíquicas, podendo acometer o neonato e a fertilidade. Em mulheres não alcoólicas, o consumo de forma aguda parece não afetar o funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano [1,2]. No entanto, o alcoolismo crônico, com ou sem alterações no fígado, está geralmente associado a severos desarranjos funcionais reprodutivos, incluindo quadros de amenorréia, oligomenorréia, dismenorréia, hipo ou infertilidade, abortos espontâneos [3,4], perda da libido e menopausa prematura [5,6]. Estudos realizados em mulheres alcoólicas crônicas [3] e em macacas [7] evidenciaram amenorréia acompanhada de oscilações de baixa produção de estrógeno e LH, atrofia ovariana e endometrial. Krueger et al. [8] observaram, em ratas, prolongamento da fase de diestro. Outros trabalhos apontam o tratamento crônico com etanol como acentuador da permanência na fase de diestro, com diminuição do LH circulante [9] e indícios de anestro permanente [10]. Krueger et al. [11] descreveram alterações do ciclo estral e de períodos de abertura vaginal [12]. Na literatura há poucos relatos envolvendo reprodução e alcoolismo em ratas. Os animais UCh são modelos das doenças relacionadas ao alcoolismo, fundamentais para o entendimento dos efeitos do alcoolismo crônico na reprodução. O objetivo do presente estudo foi analisar a influência da ingestão crônica do etanol sobre a estrutura e a biometria dos ovários de ratas das variedades UChA e UChB (bebedoras voluntárias de etanol a 10%).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e manejo experimental

Foram utilizadas 42 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), adultas (4 meses), com peso médio de 280g, cujas matrizes foram importadas do biotério do Departamento de Farmacologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile. Os animais constituíram três grupos: 1º) ratas UChA de consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol) e consumo médio de etanol de 1,9g/100g/dia, 2º) ratas UChB de consumo voluntário de etanol a 10% e consumo médio de etanol de 4,0g/100g/dia e 3º) ratas Wistar de consumo voluntário de água utilizadas como controle, cedidas pelo Biotério Central do *Campus* de Botucatu/UNESP. As fêmeas tratadas receberam etanol durante 60 dias, com dieta sólida constituída de ração Nuvital e o protocolo experimental seguem os princípios éticos de pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocol. nº 84/07- CEEA - IBB/UNESP).

Todos os animais foram alojados em caixas de polipropileno (43x30x15cm), com substrato de maravalha, e mantidos em ambiente adequado sob condições controladas (12h de ciclo claro/escuro e aproximadamente 23°C). Após 60 dias de ingestão crônica de etanol, as fêmeas em estro, monitoradas pela técnica do esfregaço vaginal, foram eutanasiadas para coleta e processamento do material.

Microscopia de Luz (MLuz): Historesina

Foram eutanasiadas em estro, após saturação anestésica com éter etílico, 18 fêmeas (seis de cada grupo). O útero, as tubas uterinas e os ovários, foram dissecados sob

microscópio cirúrgico D. F. Vasconcelos, sendo os ovários fixados em glutaraldeído 2,5%, tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, durante 6h. Os órgãos foram acondicionados em álcool 70% na geladeira, por 48h. A desidratação foi realizada em álcool 95% durante 4h e a infiltração em resina plástica “Historesin” (Reichert – Jung/Embedding Kit – Alemanha) mais álcool durante 4h. Os órgãos foram imersos em resina pura por 12h. As amostras de tecido foram incluídas e transportadas para histomoldes etiquetados (histomold - LKB – Alemanha), contendo mescla de inclusão (líquido de infiltração + endurecedor). Os histomoldes foram colocados em estufa a 60°C durante 3h. Os blocos do material incluído foram cortados com 4µm de espessura em micrótomo LEICA 2145 e, posteriormente, corados com Hematoxilina e Eosina (HE), azul de toluidina (AT), ácido periódico de Schiff (PAS), Giemsa e Tricrômico de Masson. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

MLuz: Fosfatase Ácida (FAC)

As tubas uterinas, juntamente com os ovários, e extremidades craniais dos cornos uterinos esquerdo foram coletados e dissecados. O material foi coberto com talco para a preservação do tecido e congelado em nitrogênio líquido. Os órgãos reprodutores congelados foram transferidos para câmara de criostato LEICA CM1800 Cryostat (Alemanha) a -20°C e mantidos durante 15 a 20 minutos. Os órgãos foram colados pela extremidade cranial do corno uterino em suporte metálico, utilizando-se adesivo especial: “Tissue Freezing Medium” JUNG (Einbettmedium/Laborgebrauch/Germany). Os ovários foram seccionados com 10µm de espessura. Os cortes foram incubados a 37°C por 30 minutos, em meio constituído de Nitrato de Chumbo (20mg), β-Glicerofosfato de Sódio

(32mg) e tampão acetato (10mL) 0,1M pH=5,0. Após o período de incubação, os cortes foram lavados em água destilada e imersos em solução de Sulfeto de Amônio a 1% por 2 minutos. Finalmente, os cortes foram lavados em água destilada, contrastados com Metil Green 2% por 1 minuto e desidratados em álcool absoluto. Seguiu-se a etapa de montagem das lâminas no meio sintético [13]. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

MLuz: Fosfatase Alcalina (Fal)

A técnica de histoquímica para a fosfatase alcalina foi realizada com base no material, nos procedimentos de preservação e no método de corte em Criostato utilizado para a fosfatase ácida. Após obtenção dos cortes a 10µm, o material foi incubado a 37°C por 40 minutos em meio constituído de Barbiturato de Sódio 2% (10mL), β-Glicerofosfato de Sódio 3% (10mL), Cloreto de Cálcio 2% (20mL), Sulfato de Magnésio 5% (1mL) e água destilada (5mL), sendo regulado e mantido o pH=8,9. Posteriormente ao período de incubação, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e imersos em solução de Nitrato de Cobalto 2% por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água corrente destilada, imersos em Sulfeto de Amônio 0,5% por 1 minuto e novamente lavados em água destilada. Finalmente, as lâminas foram montadas em meio de gelatina glicerinada Forrast's. As lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise da microscopia eletrônica de transmissão, cinco ratas de cada grupo (UChA, UChB e controle) foram eutanasiadas por decapitação e, após laparotomia abdômino-pélvica, tiveram o ovário direito coletado e fixado por imersão em solução de Karnovsky modificada, contendo 2,5% de glutaraldeído, 2,0% de paraformaldeído em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH 7,2. Os fragmentos dos ovários contendo 0,5mm de largura permaneceram em glutaraldeído durante 3h a 4°C. Em seguida, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1,0% no tampão fosfato de sódio durante 2h e incluídos em resina plástica Araldite. Após a inclusão, cortes de 0,5µm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo LKB 8800, “*ultratorne III*”, com navalha de vidro e corados com azul de metileno e azur II. A utilização dos cortes corados favoreceu na seleção de áreas específicas para observações ao microscópio eletrônico. Posteriormente à seleção, os blocos foram trimados e obtidos cortes ultrafinos, sendo contrastados pelo Acetato de Uranila [14] e Citrato de Chumbo [15]. Todas as análises e documentações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100, disponível no Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP.

Peso corporal e dos órgãos genitais

Ao final do tratamento, cada animal foi anestesiado com éter etílico, pesado e submetido à laparotomia abdômino-pélvica para remoção dos órgãos genitais (útero, ovários e tubas uterinas) que foram pesados em conjunto. Os ovários foram pesados separadamente. A determinação do peso corporal, do conjunto dos órgãos genitais e dos

ovários foi realizada em balança analítica Owlabor, disponível no laboratório de Anatomia do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

Contagem e análise dos folículos e corpos lúteos

Para a análise morfométrica utilizou-se o material preparado para a microscopia de luz, analisando-se um corte e desprezando-se os dez cortes subsequentes, resultando em 12 repetições analisadas por ovário [16]. Foram contados e analisados os folículos primordiais, primários, em crescimento (acima de duas camadas de células até início de antro folicular), preantrais, antrais, maduros, atresícos, e os corpos lúteos hemorrágicos e em processo de regressão. Os dados foram avaliados através do sistema de análise de imagens computadorizado KS-300 – Zeiss, utilizando-se objetivas de 20x para observação dos folículos primários e primordiais e 10x para as demais estruturas, disponível no laboratório de Anatomia do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

Dosagem hormonal

Após a decapitação, os animais tiveram uma amostra de sangue coletada para dosagem dos hormônios LH, FSH, β -estradiol e progesterona, cujas concentrações plasmáticas foram mantidas em tubos com heparina, centrifugados a 2.500 r.p.m e determinados através de reação com duplo anticorpo, utilizando-se o método de radioimunoensaio (RIE). Os anticorpos específicos foram anti-rat LH-S10, FSH-S11, diluídos em soro de coelho. O segundo anticorpo foi produzido em ovelhas, com base na antigamaglobulina de coelho. Todos os hormônios foram iodinados com 125 Iodo da Amersham Biosciences (USA) e dosados em único ensaio para evitar erros inter-ensaio.

Realizaram-se as análises no laboratório de Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia – USP – Ribeirão Preto, SP.

Análise estatística

As variáveis referentes ao peso corporal e dos órgãos genitais, duração dos ciclos estrais, concentração dos hormônios LH, FSH, β -estradiol, progesterona e a contagem dos folículos e corpos lúteos no ovário, ao final do tratamento, foram avaliadas através da análise de variância em experimentos inteiramente casualizados e os resultados apresentados em tabelas, considerando-se um nível de 5% de significância [17]. Utilizou-se a técnica da análise de variância multivariada para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de médias de Bonferroni [18].

Técnica aplicada no monitoramento do ciclo estral

Durante a segunda metade do período experimental, os animais foram diariamente monitorados através da técnica do esfregaço vaginal [19]. Dessa forma, as células descamadas do epitélio vaginal foram coletadas com cotonete umedecido em solução fisiológica e transferidas para as lâminas. Fixou-se o horário da coleta (9h). Após a coleta, seguiu-se a fixação em álcool-éter (1:1) durante 10 min. e hidratação até álcool 70%. Seguindo a hidratação, o material foi imerso em água corrente durante 5 min. e corado com hematoxilina por 1 min. 30 seg. Após a viragem da hematoxilina, o material foi corado com eosina (40 seg.) e, posteriormente, desidratado até álcool absoluto. As lâminas foram diafanizadas em álcool-xilol, xilol I e xilol II e montadas com lamínulas. Todas as lâminas

foram analisadas em microscópio digital Axiophot II Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

RESULTADOS

Após 60 dias, que compreendem ao período de ingestão crônica de etanol, pôde-se inferir que não houve diferença significativa entre o peso médio no início e final do experimento entre os grupos UChA, UChB e controle, porém os animais do grupo UChB iniciaram o tratamento com peso homogêneo médio menor, embora não estatisticamente significativo (Tabela 1). No entanto, os animais dos grupos UChA, UChB e controle obtiveram, significativamente, ao final do experimento, um ganho de peso corpóreo em relação ao peso médio inicial (Tabela 1). Entre os Índices de ganho de peso corpóreo, o grupo UChB apresentou, de forma significativa, pouco mais que o dobro, em percentagem, do ganho de peso dos animais UChA e controle (Fig. 1).

O peso absoluto dos ovários não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Há tendência de maior peso ovariano no grupo controle comparado ao UChA e UChB. O grupo UChB apresentou, significativamente, menor peso relativo dos ovários em relação aos animais controles (Tabela 2). Os pesos absoluto e relativo do conjunto dos órgãos (útero, tubas uterinas e ovários) não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos, embora houve tendência de maior peso do conjunto no grupo controle comparado ao UChA (Tabela 2).

A análise do ciclo estral nos animais UChA e UChB evidenciou, com nitidez, ciclos estrais irregulares. A ciclagem mostrou-se contínua, com todas as fases bem definidas,

contudo a duração média de cada ciclo foi significativamente maior nas variedades UChA e UChB comparado ao grupo controle (Tabela 3). Os animais consumidores de etanol apresentaram maior tempo de permanência ou alargamento na fase de estro em comparação aos animais controles (Tabela 3), tendo essa fase variado de 2 a 5 dias entre os ciclos.

A dosagem hormonal de FSH (ng/ml), LH (ng/ml), progesterona (ng/ml) e β -estradiol (pg/ml) presentes no plasma sanguíneo dos animais não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 4). Há tendência de menor concentração de LH plasmático nos animais UCh em relação aos controles. O grupo UChB apresentou tendência de maior concentração plasmática de progesterona e os animais controles menor tendência na distribuição plasmática de β -estradiol.

A contagem dos folículos e corpos lúteos presentes nos ovários dos diferentes grupos mostrou, significativamente, redução do número de folículos primordiais no grupo UChA em comparação aos animais UChB e deste em relação aos controles (Tabela 5). Houve tendência de menor quantidade de folículos primários no grupo UChA comparado aos outros grupos. Os folículos preantrais apareceram com maior frequência nos ovários dos animais UChB (Tabela 5). Os ovários das ratas UChB apresentaram, significativamente, maiores frequências em folículos atrésicos em relação aos grupos UChA e controle. As demais mensurações não diferiram estatisticamente.

Os ovários das variedades UCh e controle apresentaram, no estroma cortical e medular, todos os componentes estruturais característicos da fase de estro (Fig. 2 A-C), embora em diferentes estágios de desenvolvimento e regressão. O epitélio ovariano variou entre pseudoestratificado alto e colunar baixo (Fig. 2 D) e túnica albugínea fibrosa em algumas regiões (Fig. 2 G) nos animais UCh. Tecido fibroso constituindo o corpo *albicans*

e fibrose ao redor dos corpos lúteos estiveram presentes no grupo UChB (Fig. 2 E, 2 H). Nos animais controles, o epitélio foi regular do tipo cúbico simples e a túnica albugínea fibrosa na periferia do córtex ovariano (Fig. 2 F, 2 I).

Nos animais consumidores de etanol, os folículos secundários, antrais e pre-ovulatórios apresentaram atresia avançada na camada granulosa (Fig. 3 A-E). No grupo UChB, inúmeros folículos antrais atrésicos foram encontrados apresentando as características sugestivas do processo final da morte celular apoptótica (Fig. 3 C, 3 E). Figuras mitóticas na camada granulosa dos folículos foram observadas em todos os grupos, com maior frequência nos folículos em crescimento do grupo UChA (Fig. 3 F) e menor no grupo UChB (Fig. 3 H) e controle (Fig. 3 G). O grupo UChA apresentou folículos secundários com metacromasia entre as células da granulosa, preferencialmente nas regiões próximas ou de contato com o ovócito e forte reação nas fendas precursoras da cavidade antral (Fig. 4 A). Algumas granulações metacromáticas apareceram nas cavidades dos folículos antrais. As reações P.A.S positivas, nestes animais, ficaram restritas na camada granulosa de alguns folículos secundários e antrais (Fig. 4 F). A zona pelúcida de alguns ovócitos desenvolvendo-se nos folículos de crescimento foram P.A.S positivas nos animais UChA (Fig. 5 A). Nos folículos antrais das ratas UChA, houve reação à fosfatase ácida (FA) entre as células da granulosa (Fig. 5 C). Os folículos secundários revelaram poucos sítios de reação à FA, preferencialmente nas zonas periféricas da camada granulosa (Fig. 5 F). Em folículos secundários e antrais, a reação com fosfatase alcalina (FAL) revelou fortes marcações na região da teca interna (Fig. 6 A). O ovário dos animais UChB evidenciou folículos primários e secundários com intensas reações metacromáticas entre as células da granulosa (Fig. 4 B e 4 D) e folículos antrais com granulações acentuadas no antro e

regiões marcadas na camada granulosa (Fig. 4 D). Algumas reações P.A.S positivas, nesses animais, foram encontradas no antro de folículos em crescimento (Fig. 4 G). Ainda nos animais UChB, as células da granulosa dos folículos antrais, apresentaram forte resposta à reação com FA (Fig. 5 D). Já a maioria dos folículos em crescimento apresentou forte reação à FA com formação de grumos compactados no citoplasma e distribuídos ao longo da camada granulosa (Fig. 5 G). Em outros folículos de crescimento, reações com FA ficaram restritas nas células próximas a zona de transição com a teca interna (Fig. 5 H). Os animais UChB exibiram reações à FAL mais intensas na teca interna dos folículos secundários (Fig. 6 B, 6 D) e tênue nos folículos antrais em relação aos animais UChA e controle (Fig. 6 A, 6 C e 6 E).

Nos animais controles, os folículos secundários apresentaram reações metacromáticas de forma uniforme e pouco intensa (Fig. 4 C) nas células da granulosa. Os folículos antrais, em sua maioria, não mostraram metacromasia (Fig. 4 E). No grupo controle, os folículos em crescimento mostraram fortes reações com P.A.S (Fig. 4 H), e os ovócitos, em variados graus de desenvolvimento folicular, exibiram reações P.A.S. positivas delimitando a zona pelúcida (Fig. 5 B). Os folículos em crescimento, nestes animais, foram destituídos de qualquer resposta à reação com FA (Fig. 5 E). A técnica da FAL, nestas ratas, implicou em tênue marcação nas camadas tecais de folículos secundários e antrais (Fig. 6 C e 6 E).

O estroma ovariano dos animais UCh foi preenchido com grandes massas de tecido glandular intersticial, composto de células com núcleos esféricos e citoplasma amplo vacuolizado (Fig. 6 G, 7 A e 7 B). As glândulas apresentaram região central secretora P.A.S. positiva no grupo UChA (Fig. 7 A) e reações ainda mais intensas no grupo UChB

(Fig. 7 B). O estroma medular nos animais controles mostrou-se predominantemente fibrocelular (Fig. 6 F). No grupo UChA, vários mastócitos apresentaram-se dispersos no tecido estromal medular, evidenciando núcleo esférico e citoplasma granular metacromático (Fig. 7 D e 7 E). Nos grupos UCh, a vascularização da medula estromal foi semelhante para a reação com FAL (Fig. 7 F e 7 G).

Os corpos lúteos das ratas UCh e controles apresentaram células luteínicas, com núcleos centrais e citoplasma eosinofílico com abundante presença de vesículas lipídicas e células paraluteínicas, com citoplasma escasso e núcleo intensamente corado (Fig. 2 E, 2 G, 2 H, 8 G-H). Os vacúolos autofágicos contendo fragmentos celulares em degeneração foram comuns no grupo UChA (Fig. 8 G) e, em algumas formações luteínicas das ratas UChB (Fig. 8 H). Os corpos lúteos hemorrágicos e em processo degenerativo, nos animais UChA, apresentaram reação à FA destacando inúmeros grumos associados (Fig. 5 C, 5 F e 8 A). Também nestes animais, a atividade da FAL demarcou vascularização nos corpos lúteos hemorrágicos (Fig. 8 D). No grupo UChB, estas estruturas mostraram reações à FA mais intensas em alguns locais e discretas em outros (Fig. 5 G, 5 H e 8 B). A reação com FAL destacou ampla vascularização nos corpos lúteos hemorrágicos destes animais (Fig. 8 E). Os corpos lúteos emergentes e em regressão, nas ratas controles, apresentaram reações isoladas e de baixa intensidade à FA (Fig. 8 C). Corpo lúteo hemorrágico com pouca reação à FAL também foi encontrado (Fig. 8 F). Sítios inflamatórios com presença de infiltrado leucocitário (Fig. 8 H) e tecido lúteo com atividade macrofágica foram notados nas variedades UCh (Fig. 8 G e 8 H), com maior incidência no ovário dos animais UChA.

A análise em microscopia eletrônica de transmissão revelou, na camada granulosa de folículos em crescimento, mitocôndrias edemaciadas no grupo UChA (Fig. 9 A), e nos

animais UChB, vacúolos citoplasmáticos com material heterogêneo e núcleos com avançada condensação da cromatina (Figs. 9 B e 9 C), em comparação às células da granulosa do grupo controle (Fig. 9 D). A lâmina basal, limitando a zona de transição entre a camada granulosa e a teca interna, apresentou desorganização de seus componentes estruturais nos animais UChB (Fig. 9 F), enquanto nos grupos UChA e controle mostrou-se preservada (Figs. 9 E e 9 G). Nos grupos UChA e UChB, o citoplasma das células tecais mostrou-se quase totalmente preenchido por gotas lipídicas (Figs. 9 H e 9 I). O ovócito do grupo UChA apresentou grânulos corticais menores e com material mais e menos eletrônico (Fig. 10 A) em relação ao UChB (Fig. 10 B). Nos animais UChB, o ovócito exibiu núcleo com cromatina ativa (Fig. 10 D), citoplasma carregado de pequenas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso de aspecto curvilíneo (Fig. 10 B e 10 D), diferente daqueles encontrados nos folículos dos animais UChA e controle (Fig. 10 A e 10 C).

As células da glândula intersticial nos animais UChA foram providas de grandes mitocôndrias associadas a gotas lipídicas (Fig. 11 A), enquanto grandes vacúolos citoplasmáticos apareceram no grupo UChB (Fig. 11 B). Nos corpos lúteos, as células luteínicas dos animais UChA apresentaram alguns núcleos com cromatina condensada na periferia (Fig. 11 C) e vacúolos autofágicos com material pouco ou bastante eletrônico (Figs. 11 D e 11 E). No grupo UChB, algumas células luteínicas evidenciaram mitocôndrias com crista tubular preservada, núcleos com reentrâncias e marginalização da cromatina (Fig. 11 F). Alguns vacúolos digestivos dispersos no citoplasma (Fig. 11 G) foram encontrados semelhantes aos do grupo UChA, porém em menor quantidade e tamanho. No grupo controle, o complexo de Golgi organizado e o trânsito de vesículas (Fig. 11 H) contribuem com a característica secretora pela célula luteínica.

DISCUSSÃO

Os grupos UCh e controle apresentaram ganho de peso corpóreo em relação ao início do experimento, com destaque para o grupo UChB, corroborando com Martinez et al. [20,21]. Nas variedades UCh, uma característica comum é não haver redução da massa corpórea durante a vida adulta. Sforcin et al. [22], Sanchis et al. [9], Bo et al. [12] e Ratcliffe et al. [23] observaram redução ou breve ganho de peso corpóreo em relação aos seus controles durante o período experimental. Em contrapartida, experimentos envolvendo diferentes concentrações e vias de administração de etanol [24,8,25] evidenciaram manutenção do peso corporal, sem diferir de seus controles isocalóricos. Os resultados sugerem aproveitamento das calorias do etanol, principalmente pelo grupo UChB, evitando perda de peso corpóreo. Os animais UCh mostraram tendência de menor peso dos ovários e redução do peso relativo dos ovários nos animais UChB. Atrofia ovariana é relatada em ratas frente ao alcoolismo crônico [11,25] e em mulheres alcoólicas não cirróticas [26]. Neste trabalho, a atrofia ovariana ficou restrita à região medular, caracterizando redução do peso ovariano total nos animais consumidores de etanol. O conjunto dos órgãos reprodutivos nos animais UChA apresentou menor peso comparado aos controles. Gavalier et al. [25] e Van Thiel et al. [27] verificaram redução no peso do útero, ovários e tubas uterinas de ratas Wistar.

O ciclo estral nos animais UCh foi irregular com ciclos longos e permanência na fase de estro. O ovário pode responder às alterações cíclicas induzidas promovendo um estro vaginal constante, pseudogravidez repetida, ou por condição de anestro. Krueger et al. [8] observaram prolongamento da fase de diestro. Outros achados apontam o tratamento

crônico do etanol como acentuador da permanência na fase de diestro, com diminuição do LH [9] e anestro permanente [10]. Há tempos, os padrões de estro persistente, em roedores, foram descritos como incapacidade de realização da ovulação, devido às concentrações baixas de LH plasmático, podendo culminar em formações císticas. Esses ovários são, geralmente, polifoliculares e desprovidos de corpos lúteos [28]. No presente trabalho, houve menor concentração plasmática de LH nos grupos UCh, no entanto, ocorreu ovulação e luteogênese. Talvez a redução nos níveis de LH não seja o suficiente para causar bloqueio no processo de ovulação. Em concordância parcial, alguns autores relatam o estro prolongado em ratas tratadas com etanol sob diferentes concentrações [29,30], porém acompanhado de ausência de ovulação. Macacas que receberam injeções de etanol 0,12g/kg de peso, no final da fase lútea do ciclo menstrual, apresentaram níveis de LH reduzidos e severos quadros de amenorréia instalados [7]. O etanol possui a propriedade de inibir os receptores glutamatérgicos e estimular os gabaérgicos [31,32,33]. Receptores gabaérgicos ativados tendem a inibir a atividade de neurotransmissores, sugerindo resposta diminuída da secreção de noradrenalina, responsável pela síntese e secreção de LHRH hipotalâmico, ou efeito direto do etanol na síntese de LHRH ou LH. O alcoolismo crônico parece aumentar a produção estrogênica, inibindo o FSH e interferindo na foliculogênese e luteogênese em mulheres [34]. Em ratas tratadas com etanol, a concentração de estradiol e progesterona foi menor e LH maior em relação aos controles, enquanto o FSH não diferiu entre os grupos [35]. Resultados semelhantes ao presente trabalho o qual implica em redução e manutenção dos níveis de LH e FSH, respectivamente, foram encontrados em ratas tratadas com 5% [24] e infundidas com 95% de etanol [36].

Folículos em estágios de atresia na camada granulosa foram encontrados nas variedades UCh. Atresia folicular avançada foi marcante, principalmente, nos folículos antrais no grupo UChB. Em concordância parcial, estudos sobre o efeito indireto do etanol no tecido ovariano, administrado de forma aguda 3mg/kg via intraperitoneal, apontaram bloqueio da ovulação, diminuição dos níveis de LH e presença de células apoptóticas nos folículos [37]. Atresia folicular ocorre via apoptose em ratas [38,39]. Pode-se inferir, pelo prolongamento do estro observado nos animais UCh, que houve redução na produção de estradiol pelas células da granulosa, embora a dosagem hormonal não tenha corroborado com essa hipótese. Também houve o aparecimento de tecido glandular intersticial nos animais UCh, principalmente UChB, organizados em aglomerados de células oriundas das camadas tecais de folículos que se tornaram atrésicos, contribuindo com os níveis hormonais de estradiol e testosterona na corrente sanguínea.

As reações metacromáticas foram relevantes nos folículos secundários e antrais dos animais UCh. O desenvolvimento folicular, com posterior formação da cavidade antral, é processo dependente de moléculas com capacidade em reter água, envolvidas com a foliculogênese e fertilização [40,41]. Vários tipos de proteoglicanos são sintetizados pelas células da granulosa em resposta a certos tipos de hormônios e fatores parácrinos [42]. O corante empregado (azul de toluidina + borato de sódio pH=8,0) reagiu somente com polissacarídeos ácidos não sulfatados (até pH=4,0) presentes no fluido folicular das ratas UCh. Considerando-se que, de forma geral, no ovário, grande parte dos proteoglicanos são sulfatados [43], seu metabolismo pode ter sido afetado. As interações entre proteoglicanos e ácido hialurônico são essenciais para estabilidade e formação da matriz extracelular do líquido folicular [44]. As reações com P.A.S foram ressaltadas com maior intensidade na

zona pelúcida e folículos em crescimento dos animais controles. Pode-se inferir maior afinidade por polissacarídeo neutro presente nestes sítios, o que mostrou ser mais discreto nos animais consumidores de etanol.

A reação com fosfatase ácida foi intensa nos folículos antrais e algumas regiões dos folículos secundários das ratas UChA e mais intensa ainda nos folículos antrais das ratas UChB, fazendo alusão ao processo de degeneração por atresia. A atividade da fosfatase ácida aumentou com o desenvolvimento folicular, evidenciando reações moderadas na camada granulosa e fortes reações na teca interna em ratas Wistar [45]. As fosfatases ácida e alcalina são essenciais na regulação de síntese, transporte e atividade degenerativa das células [46,47]. Sua atividade e localização diferem quanto aos componentes foliculares [48,47]. A atividade da fosfatase ácida tem origem das atividades lisossomais durante o desenvolvimento e maturação folicular [48,47]. A fosfatase alcalina foi mais intensa na teca interna de folículos secundários dos grupos UCh, sendo forte nos folículos antrais do grupo UChA e fraco nos UChB. Sangha et al. [45] verificaram fortes reações com fosfatase alcalina, exclusivamente nas camadas tecaais, de folículos preantrais. Essa atividade, geralmente em zonas de vascularização tecidual, é indicativa de transporte de nutrientes e secreções através da membrana [49]. Em geral, os corpos lúteos hemorrágicos e em regressão apresentaram vacúolo citoplasmático com material característico de células e organelas em estágio degenerativo nos animais UCh. A fosfatase ácida reagiu intensamente nesses corpos lúteos, principalmente nos ovários das ratas UChA. Sangha et al. [45] observando corpos lúteos de ratas Wistar, encontraram pouca resposta à fosfatase ácida nos hemorrágicos em comparação àqueles em regressão, provenientes de ciclos anteriores. Sawyer et al. [50] e Armstrong et al. [51] relacionam o aumento na intensidade de fosfatase

ácida no corpo lúteo com o mecanismo de produção e secreção de esteróides. Contrariamente, sugere-se, devido presença de infiltrado leucocitário e atividade macrofágica, qualquer atividade degenerativa. Eosinófilos e neutrófilos são recrutados durante a ovulação, período de *inflamação fisiológica* [52] e parecem fazer parte da luteólise no processo de regressão lútea [53] e após tratamento com $\text{PGF}_2\alpha$ [54]. Os corpos lúteos hemorrágicos dos animais UChB apresentaram reação mais intensa à fosfatase alcalina em relação aos grupos UChA e controle, destacando ampla vascularização. Encontrou-se na medula ovariana dos animais UChA, grande quantidade de mastócitos, em relação aos outros grupos, sugerindo resposta mediada indireta dos efeitos tóxicos do etanol nesta região. Em espécies com ciclo estral curto (ratas, hamster), mastócitos são encontrados somente na medula ovariana [55], diferentemente de espécies com ciclo estral longo [56]. No ovário, as alterações morfofisiológicas, oriundas de desequilíbrio funcional induzido, podem ocorrer mediante efeito direto, pela interação do indutor com receptores hormonais ou sinais de transdução de numerosos processos reguladores, como na síntese de esteróides, fatores de crescimento, mensageiros químicos ovarianos, entre outros; ou de forma indireta através do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano e na síntese ou liberação de fatores relacionados ao desenvolvimento ovariano por outros órgãos comprometidos.

As células da granulosa de folículos ovarianos das ratas UCh apresentaram alterações mitocondriais, vacúolos com diferentes tamanhos e núcleos em degeneração celular, corroborado com as observações em microscopia de luz. Os vacúolos encontrados no citoplasma de células da granulosa íntegras no grupo UChB, sugerem resíduos fagocitados de células vizinhas que entraram em degeneração, como em cadela [57], camundongo [58] e rata [59]. As células da teca interna do grupo UChA, e principalmente

UChB, apresentaram vesículas lipídicas de tamanho variado, podendo inferir um metabolismo alterado pelo álcool interferindo com a síntese dos hormônios esteróides. Martinez et al. [20,60] evidenciaram aumento do tamanho e número das gotas lipídicas nas células epiteliais da tuba uterina e útero de ratas submetidas ao alcoolismo crônico. Ratas tratadas com aguardente-de-cana, durante 90 dias, apresentaram gotas lipídicas e vacúolos na camada granulosa [61]. Segundo Lieber et al. [62] e Hirata & Hirata [63] ratos que ingerem grandes quantidades de etanol tendem a acumular gordura no fígado devido ao bloqueio da via da β -oxidação dos ácidos-graxos. O edema mitocondrial presente na maioria das células da granulosa do grupo UChA pode estar associado à ruptura da membrana externa mitocondrial devido mudanças em seu potencial hidroeletrolítico, levando a exposição de fatores como o citocromo C, desencadeador da cascata apoptótica [64]. Os animais UChA também exibiram mitocôndrias gigantes no citoplasma da granulosa de folículos em crescimento. Em pacientes com diagnóstico de patologia hepática causado pelo consumo de etanol, 93% apresentaram biópsias com presença de mitocôndrias gigantes. Algumas mitocôndrias foram observadas sozinhas, e geralmente, associadas a lipídios [65].

Os folículos primordiais apresentaram-se em menor número nos ovários das linhagens UCh. Essa redução pode ser devida ao efeito tóxico direto do etanol, sendo o desenvolvimento folicular inicial independente de ações hormonais. Srivastava et al. [66] avaliaram os efeitos do etanol a 5% administrado durante 15 dias sobre a função ovariana de ratas pré-púberes e não encontraram diferença no desenvolvimento dos folículos ovarianos. Os ovários dos animais UChB apresentaram maiores frequências de folículos em atresia, sendo em maioria do tipo antral como mencionado através da análise morfológica.

Em ciclos regulares, folículos atrésicos são comuns na fase de metaestro e diestro [67]. Os folículos pré-antrais presentes no grupo UChB foram numerosos em virtude do seu estágio posterior encontrar-se em degeneração. Ratas ingerindo álcool a 5%, durante 60 dias, apresentaram ovários com poucos folículos imaturos, ausência de corpos lúteos hemorrágicos e de ciclos anteriores, caracterizando a anovulação [25]. Anormalidades na morfologia do ovócito e prejuízos na ovulação foram observados em camundongos pré-púberes expostos a pequenas doses de etanol, durante longo período de tratamento [68]. Em contraste, a ausência de corpos lúteos foi verificada em mulheres alcoólicas [69]. Conclui-se que há irregularidades do ciclo estral nas linhagens UCh e, conseqüentemente, alterações estruturais e biométricas do tecido ovariano na fase de estro do ciclo estral.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nossa gratidão ao Laboratório de Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia - USP de Ribeirão Preto, SP, pela colaboração na análise dos hormônios e também a agência CAPES e FAPESP pelo auxílio fornecido para execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] Mendelson JH, Mello NK, Ellingboe J. Acute alcohol intake and pituitary gonadal hormones in normal human females. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;218:23-6.
- [2] Valimaki M, Harkonen M, Ylikahri R. Acute effects of alcohol on female sex hormones. *Alcoholism Clin Exp Res*. 1983;7:289-93.
- [3] Hugues JN, Coste T, Perret G, Jayle MF, Sebaoun J, Modigliani E. Hypothalamo-pituitary ovarian function in thirty-one women with chronic alcoholism. *Clin Endocrinol*. 1980;12:543-51.
- [4] Harlap S, Shiono PH. Alcohol, smoking and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. *Lancet*. 1980;26:173-6.
- [5] Borhanmanesh F, Haghighi P. Pregnancy in patients with cirrhosis of the liver. *Obstet Gynecol*. 1970;36:315-24.
- [6] Green P, Rubin L. Amenorrhea as a manifestation of chronic liver disease. *Am J Obstet Gynecol*. 1959;58:141-6.
- [7] Mello NK, Bree MP, Mendelson JH. Alcohol self-administration disrupts reproductive function in female Macaque Monkeys. *Science*. 1983;221:677-9.
- [8] Krueger WA, Bo WJ, Rudeen PK. Estrous cyclicity in rats fed an ethanol diet for four months. *Pharmacol Biochem Behav*. 1983;19:583-5.
- [9] Sanchis R, Esquifino A, Guerri C. Chronic ethanol intake modifies estrous cyclicity and alters prolactin and LH levels. *Pharmacol Biochem Behav*. 1985;23:221-4.
- [10] Emanuele NV, Lapaglia N, Emanuele MA. Impact of acute and chronic ethanol exposure on prolactin in both male and female rats. *Endocrine*. 2001;16:29-37.

- [11] Krueger WA, Bo WJ, Rudeen PK. Female reproduction during chronic ethanol consumption in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982;17:629-31.
- [12] Bo WJ, Krueger WA, Rudeen PK, Symmes SK. Ethanol-induced alterations in the morphology and function of the rat ovary. *Anat Rec.* 1982;202:255-60.
- [13] Barka T. A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *Nature.* 1960;16:187-248.
- [14] Watson ML. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958;4:727-30.
- [15] Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;71:208-12.
- [16] Plowchalk DR, Smith BJ, Mattison DR. Assessment of toxicity to the ovary using follicle quantitation and morphometrics. *Methods Toxicol.* 1993;3b,57-68.
- [17] Banzatto DA, Kronka SN, eds. *Experimentação agrícola*, 3ed. Jaboticabal: Funep; 1989.
- [18] Johnson RA, Wichern DW, eds. *Applied multivariate statistical analysis*, 5th ed. New Jersey: Prentice Hall; 2002.
- [19] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62:609-14.
- [20] Martinez M, Branco JR, Cagnon VHA. Ultrastructural changes on the epithelial cells of uterine tubes of Wistar rats ethanol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1999;31:273-8.
- [21] Martinez FE, Laura IA, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregón E. Morphology of the ventral lobe of the prostate and seminal vesicles in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UChB). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2001;33:99-106.

- [22] Sforcin JM, Monteiro CMR, Lopes CEF, Sapatera AC, Ferreira WJN. Perfil bioquímico e análise morfológica do ovário de ratas submetidas ao consumo prolongado de álcool. *Rev Ciênc Bioméd.* 1997;18:69-81.
- [23] Ratcliffe F. The effect of chronic ethanol administration on the growth of rats. *Arch int Pharmacodyn.* 1972;197:19-30.
- [24] Les Dees W, Skelley CW. Effects of ethanol during the onset of female puberty. *Neuroendocrinology.* 1990;51:64-9.
- [25] Gavalier JS, Van Thiel DH, Lester R. Ethanol: a gonadal toxin in the mature rat of both sexes. *Alcoholism Clin Exp Res.* 1980;4:271-6.
- [26] Valimaki MJ, Laitinen K, Tiitinen A, Steman UH, Ylostalo P. Gonadal function and morphology in non-cirrhotic female alcoholics: A controlled study with hormone measurements and ultrasonography. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1995;74:462-6.
- [27] Van Thiel DH, Gavalier JS, Lester R. Ethanol: a gonadal toxin in the female. *Drug Alcohol Depend.* 1977;2:373-80.
- [28] Huang HH, Meites J. Reproductive capacity of aging female rats. *Neuroendocrinology.* 1975;17:289-95.
- [29] Marcó J, Leandro SV, Villa I, Larralde J. Effect of ethanol on ovulation, reproduction and fetal development in the rat. *Rev Esp Fisiol.* 1981;37:395-402.
- [30] Kieffer JD, Ketchel MM. Blockade of ovulation in the rat by ethanol. *Acta Endocrinol.* 1970;65:117-24.
- [31] Khanna JM, Morato GS, Kalant H. Effect of NMDA antagonists, an NMDA agonist, and serotonin depletion on acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;72:291-8.

- [32] Darstein M, Albrecht C, Lopez-Francos L. et al. Release and accumulation of neurotransmitters in the rat brain: Acute effects of ethanol in vitro and effects of long-term voluntary ethanol intake. *Alcoholism Clin Exp Res.* 1998;22:704-9.
- [33] Korpi EL. Role of GABA_A receptors in actions of alcohol and in alcoholism: recent advances. *Alcohol Alcohol.* 1994;29:115-29.
- [34] Mello NK, Mendelson JH, Teoh SK. An overview of the effects of alcohol on neuroendocrine function in women. In: Zakhari, S, ed. *Alcohol and the endocrine system.* Bethesda, MD: The institute; 1993:139-69.
- [35] Van Thiel DH, Gavalier JS, Lester R. Alcohol-induced ovarian failure in the rat. *J Clin Invest.* 1978;61:624-32.
- [36] Wilson GT, Lawson DM. Effects of alcohol on sexual arousal in women. *J Abnorm Psychol.* 1976;85:489-97.
- [37] Ogilvie KM, Rivier C. Effect of alcohol on the proestrous surge of luteinizing hormone (LH) and the activation of LH-releasing hormone (LHRH) neurons in the female rat. *J Neurosci.* 1997;17:2595-604.
- [38] Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 1992;131:1670-6.
- [39] Greenfeld CR, Pepling ME, Babus JK, Furth PA, Flaws JA. Bax regulates follicular endowment in mice. *Reproduction.* 2007;133:865-76.
- [40] Yoshimura Y, Wallach EE. Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. *Fertil Steril.* 1987;47:22-34.
- [41] Eriksen GV, Malmstrom A, Uldbjerg N. Human follicular fluid proteoglycans in relation to in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1997;68:791-8.

- [42] Yanagishita M, Hascall VC, Rodbard D. Biosynthesis of proteoglycans by rat granuloma cells cultured *in vitro*: modulation by gonadotropins, steroid hormones, prostaglandins, and a cyclic nucleotide. *Endocrinology*. 1981;109:1641-9.
- [43] Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:229-55.
- [44] Camaioni A, Salustri A, Yanagishita M. Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Arch Biochem Biophys*. 1996;325:190-8.
- [45] Sangha GK, Guraya SS. Histochemical changes in acid and alkaline phosphatase activities in the growing follicles and corpora lutea of the rat ovary. *Acta Morphol Neerl.-Scand*. 1989;26:43-9.
- [46] Brietenecker G, Friedrich F, Kemeter P. Further investigation on the maturation and degeneration of human ovarian follicles and their oocytes. *Fertil Steril*. 1978;29:336-41.
- [47] Narimoto K, Okamura H, Mori T, Sakai M, Espey LL, Ogawa K. Cytochemical localization of acid phosphatase in the rabbit ovarian follicle. *Acta Histochem Cytochem*. 1985;18:525-38.
- [48] Elfont EA, Roszka JP, Dimino MJ. Cytochemical studies of acid phosphatase in ovarian follicles. A suggested role for lysosomes in steroidogenesis (rat). *Biol Reprod*. 1977;17:787-95.
- [49] Verma SK, Guraya SS. The localization and functional significance of alkaline phosphatase in the vertebrate ovary. *Experientia*. 1968;24:398-9.
- [50] Sawyer HR, Abel JH, McClellan MC, Schmitz M, Niswender GD. Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea *in vitro*. *Endocrinology*. 1979;104:476-86.

- [51] Armstrong DT, Dorrington JH. Androgens augment FSH-induced progesterone secretion by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1976;99:1411-14.
- [52] Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod*. 1994;50:233-8.
- [53] Standaert FE, Zamora CS, Chew BP. Quantitative and qualitative changes in blood leukocytes in the porcine ovary. *Am J Reprod Immunol*. 1991;25:163-8.
- [54] Murdoch WJ. Treatment of sheep with prostaglandin F₂ α enhances production of a luteal chemoattractant for eosinophils. *Am J Reprod Immunol*. 1987;15:52-6.
- [55] Krishna A, Beesley K, Terranova PF. Histamine, mast cells and ovarian function. *J Endocrinol*. 1989;120:363-71.
- [56] Nakamura Y, Smith M, Krishna A, Terranova PF. Increased number of mast cells in the dominant follicle of the cow: relationships among luteal, stromal, and hilar regions. *Biol Reprod*. 1987;37:546-9.
- [57] Spaniel-Borowski K. Morphological investigations on follicular atresia in canine ovaries. *Cell Tiss Res*. 1981;214:155-68.
- [58] Byskov AG. Atresia. In: Midgley AR, Sadler WA, ed. *Ovarian follicular development and function*. New York: Raven Press; 1979:41-57.
- [59] Takeo Y, Hokano M. An electron microscopic study of apoptosis in the granulosa layer of ovarian follicles in rats treated with continuous illumination. *Med Electron Microsc*. 1995;28:38-44.
- [60] Martinez M, Martinez FE, Garcia PJ, Cagnon VH, Mello Júnior W, Padovani CR. Morphometric analysis of the endometrial epithelium of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic experimental alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1999;31:469-75.

- [61] Laura IA, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. Ultrastructural and morphometric analysis on the ovary of Wistar rats after chronic ethanol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2003;35:167-76.
- [62] Lieber CS, Spritz N, DeCarli LM. Role of dietary, adipose, and endogenously synthesized fatty acids in the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. *J Clin Invest.* 1966;45:51-62.
- [63] Hirata ES, Hirata LCM. Bioquímica e metabolismo do etanol. In: Fortes JRA, Cardo WN, ed. *Alcoolismo: diagnóstico e tratamento.* São Paulo: Sarvier; 1991:57-64.
- [64] Adachi M, Ishii H. Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:487-91.
- [65] Stewart RV, Dincsoy HP. The significance of giant mitochondria in liver biopsies as observed by light microscopy. *Am J Clin Pathol.* 1982;78:293-8.
- [66] Srivastava VK, Hiney JK, Rettori V, Dees WL. Effects of ethanol on intraovarian nitric oxide production in the prepubertal rat. *J Endocrinol.* 1999;161:69-75.
- [67] Guraya M, Kaur P, Guraya SS. Morphology of the House Rat (*Rattus rattus*) ovary during the oestrous cycle. *Z Mikrosk Anat Forsch.* 1987;101:815-28.
- [68] Cebal E, Motta A, deGimeno MF. Low chronic ethanol consumption affects ovulation and PGE synthesis by the cumulus cell masses in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999;60:95-100.
- [69] Jung Y, Russfield AB. Prolactin cells in the hypophysis of cirrhotic patients. *Arch Pathol.* 1972;94:265-9.

Tabelas

Tabela 1. Médias e desvios-padrão do peso corpóreo dos animais no início e final do experimento (g), segundo os grupos e o momento de avaliação.

Grupos experimentais (N=06)	Momento de Avaliação	
	Peso Inicial	Peso Final
UChA	223,3±11,2a ¹ A ²	243,3±17,2a B
UChB	215,0±9,5a A	264,2±22,7a B
Controle	231,7±15,4a A	254,2±16,9a B

1 Duas médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem quanto aos grupos, fixado o momento (p>0,05).

2 Duas médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem quanto aos momentos de avaliação dentro do grupo (p>0,05). Análise de variância multivariada complementada com o teste de “Bonferroni”.

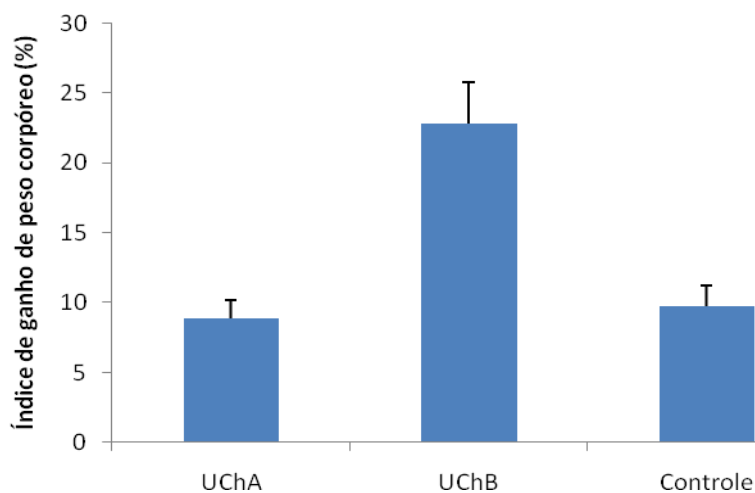


Figura 1. Índice de ganho de peso corpóreo em relação ao início do tratamento nos animais UCh e controle (Média±erro-padrão).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão das variáveis: peso dos ovários (g), peso do conjunto dos órgãos reprodutivos (útero, tubas uterinas e ovários) em (g), peso relativo dos ovários e do conjunto dos órgãos reprodutivos (g/100g peso corpóreo); (N=06).

Variáveis	Grupos		
	UChA	UChB	Controle
Peso dos ovários	0,086±0,004 ^a	0,085±0,006 ^a	0,098±0,015 ^a
Peso relativo dos ovários	0,036±0,002 ^{ab}	0,032±0,004 ^a	0,039±0,005 ^b
Peso do conjunto	0,68±0,08 ^a	0,75±0,14 ^a	0,79±0,05 ^a
Peso relativo do conjunto	0,28±0,02 ^a	0,29±0,07 ^a	0,31±0,04 ^a

^{a, b} letras distintas diferem estatisticamente entre si; p<0,05. Teste One-way ANOVA com a “posteriori” de Tukey-Kramer.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão referente ao período de duração de cada ciclo estral (dias), mediana, valor mínimo e máximo do tempo de permanência em estro por ciclo (%).

Grupos experimentais (N=07)	Duração de cada ciclo	Tempo de permanência em estro/ciclo ²
UChA	8,93±1,34 ^b	40,00(33,33;53,33) ^b
UChB	9,29±1,22 ^b	43,33(36,67;50,00) ^b
Controle	5,33±0,68 ^a	23,33(20,00;30,00) ^a

^{a, b} letras diferentes diferem estatisticamente entre si, $p < 0,05$.

$p < 0,001$; Teste One-way ANOVA com a “posteriori” de Tukey

² $p < 0,01$; Teste de Kruskal-Wallis com a “posteriori” de Dunn.

Tabela 4. Mediana e semi-amplitude da concentração plasmática dos hormônios FSH (ng/ml), LH (ng/ml), progesterona (ng/ml), β -estradiol (pg/ml) referente aos animais dos grupos UChA, UChB e controle ao final do experimento.

Variáveis	Grupos		
	UChA	UChB	Controle
FSH (ng/ml)	6,5 $\pm$ 3,85 ^a	3,90 $\pm$ 2,85 ^a	5,25 $\pm$ 2,85 ^a
LH (ng/ml)	0,40 $\pm$ 0,85 ^a	0,20 $\pm$ 1,15 ^a	0,70 $\pm$ 4,50 ^a
Progesterona (ng/ml)	19,34 $\pm$ 13,28 ^a	30,25 $\pm$ 12,97 ^a	22,16 $\pm$ 12,79 ^a
β -estradiol (pg/ml)	47,66 $\pm$ 37,90 ^a	44,73 $\pm$ 39,29 ^a	43,57 $\pm$ 19,22 ^a

^a Medianas precedidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 5. Mediana e valores mínimo e máximo das frequências de folículos e corpos lúteos nos ovários dos grupos UChA, UChB e controle.

Variáveis	Grupos		
	UChA	UChB	Controle
Folículo primordial	7,5 (4,0 – 19,0) ^a	37,5 (21,0 – 72,0) ^b	140,5 (93,0 – 273,0) ^c
Folículo primário	15,0 (9,0 – 36,0) ^a	29,0 (9,0 – 47,0) ^a	32,0 (25,0 – 54,0) ^a
Folículo crescimento	68,5 (51,0 – 107,0) ^a	82,5 (34,0 – 104,0) ^a	63,0 (21,0 – 111,0) ^a
Folículo preantral	25,5 (16,0 – 33,0) ^a	50,0 (35,0 – 55,0) ^b	34,5 (13,0 – 48,0) ^a
Folículo antral	31,0 (10,0 – 38,0) ^a	26,5 (5,0 – 37,0) ^a	36,0 (10,0 – 53,0) ^a
Folículo maduro	0,5 (0,0 – 2,0) ^a	3,0 (1,0 – 6,0) ^a	1,5 (0,0 – 14,0) ^a
Folículo atrésico	21,5 (19,0 – 32,0) ^a	49,5 (24,0 – 63,0) ^b	23,0 (10,0 – 30,0) ^a
CL hemorrágico	51,5 (40,0 – 65,0) ^a	53,5 (36,0 – 74,0) ^a	45,0 (36,0 – 51,0) ^a
CL regressão	58,0 (48,0 – 61,0) ^a	66,5 (44,0 – 87,0) ^a	52,5 (26,0 – 68,0) ^a

^{a, b, c} letras diferentes diferem estatisticamente entre si; $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis complementado com teste de comparações múltiplas entre pares de grupos.

CL: corpo lúteo.

Figura 2. Organização e córtex ovariano dos animais dos grupos UChA, UChB e controle na fase de estro.

- A) Ovário dos animais do grupo UChA. CL: corpo lúteo; FA: folículo antral; M: medula ovariana. HE. Bar=500µm.
- B) Ovário dos animais do grupo UChB. CL: corpo lúteo; FA: folículo antral. HE. Bar=500µm.
- C) Ovário dos animais do grupo controle. CL: corpo lúteo; FA: folículo antral; M: medula ovariana. HE. Bar=500µm.
- D) Epitélio de revestimento do tipo pseudoestratificado no grupo UChA. São evidenciados núcleos em diferentes posições (seta) e citoplasma na porção supranuclear da célula. HE. Bar=20µm.
- E) Corpo albicans (CA) e regiões de túnica albugínea (TA) nos animais UChB. CL: corpo lúteo. Tricrômico de Masson. Bar=50µm.
- F) Epitélio de revestimento tipo cúbico simples do grupo controle. São evidenciados núcleos esféricos e polimórficos centrais (seta) e citoplasma reduzido. HE. Bar=20µm.
- G) Túnica albugínea do grupo UChA (seta). CL: corpo lúteo; FA: folículo antral. Tricrômico de Masson. Bar=50µm.
- H) Fibras colágenas ao redor do corpo lúteo (*) do grupo UChB. CL: corpo lúteo; FPA: folículo preantral. Tricrômico de Masson. Bar=50µm.
- I) Túnica albugínea no grupo controle (seta). FA: folículo antral. Tricrômico de Masson. Bar=50µm.

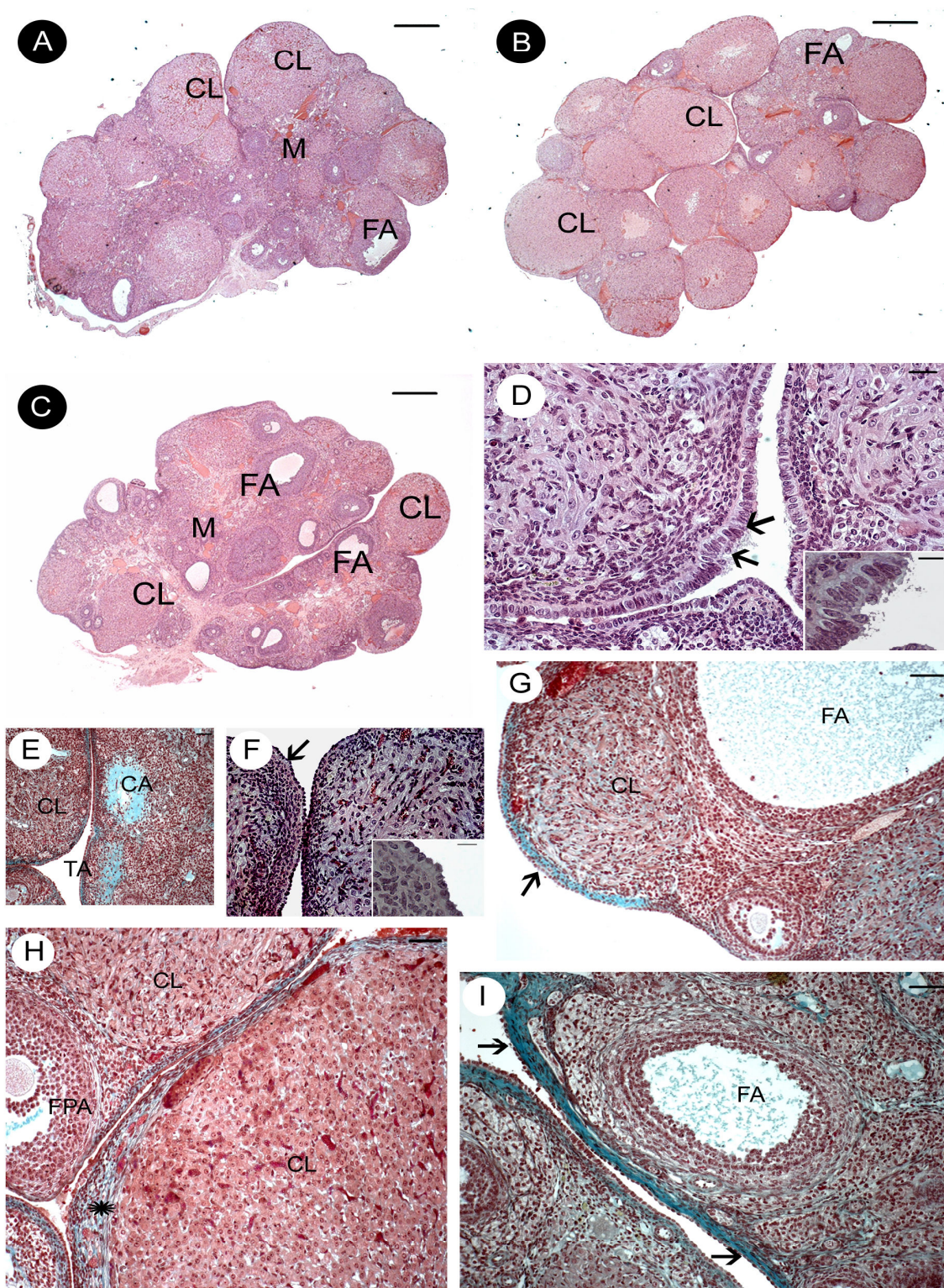


Figura 3. Micrografia dos folículos nos grupos UChA, UChB e controle.

- A) Atresia folicular na camada granulosa do grupo UChA (seta). CG: camada granulosa; A: antro; O: ovócito. HE. Bar=20µm.
- B) Atresia folicular na camada granulosa e no antro de folículo secundário do grupo UChB (seta). HE. Bar=20µm.
- C) Atresia folicular avançada no grupo UChB. São destacados núcleos fragmentados no antro (seta). A: antro. HE. Bar=20µm.
- D) Células com citoplasma hipertrofiado deslocadas na cavidade antral (seta) do grupo UChB. CG: camada granulosa; A: antro. HE. Bar=50µm.
- E) Núcleo fragmentado (seta) e núcleos picnóticos (cabeça de seta) no folículo do grupo UChB. A: antro; CG: camada granulosa. Feulgen. Bar=10µm.
- F) Folículo preantral com inúmeras figuras mitóticas (seta) no grupo UChA. CG: camada granulosa; O: ovócito. HE. Bar=20µm.
- G) Folículo preantral com raras mitoses no grupo controle (seta). CG: camada granulosa; A: antro; O: ovócito. HE. Bar=20µm.
- H) Folículo preantral com figuras mitóticas no grupo UChB (seta). CG: camada granulosa; O: ovócito. HE. Bar=20µm.

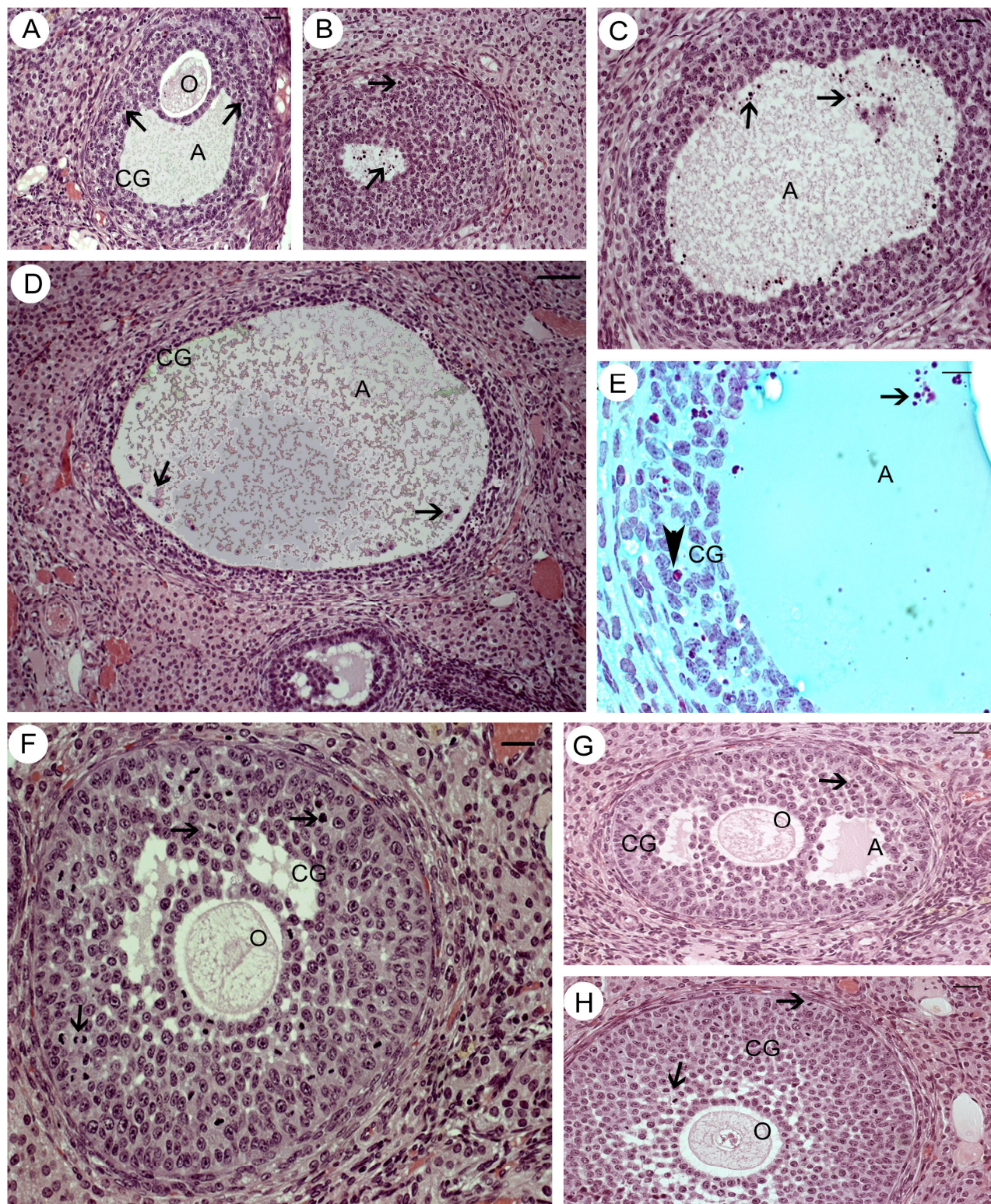


Figura 4. Micrografia dos folículos nos animais UChA, UChB e controle.

- A) Metacromasia em folículo secundário do grupo UChA (seta). CG: camada granulosa; O: ovócito. Azul de toluidina. Bar=20µm.
- B) Intensa metacromasia nos folículos de crescimento do grupo UChB (seta). CG: camada granulosa; O: ovócito. Azul de toluidina, pH=4,0. Bar=20µm.
- C) Pouca metacromasia em folículo secundário do grupo controle (seta). CG: camada granulosa; O: ovócito. Azul de toluidina. Bar=20µm.
- D) Reações metacromáticas em folículos primário, secundário e preantral no grupo UChB (seta). Azul de toluidina. Bar=50µm.
- E) Ausência de metacromasia em folículos antrais nos animais controles. Azul de toluidina. Bar=50µm.
- F) Reações PAS positivas no antro de folículos do grupo UChA (seta). PAS. Bar=20µm.
- G) Reações PAS positivas no antro de folículos do grupo UChB (seta). PAS. Bar=20µm.
- H) Intensa reação PAS positiva no antro (seta) e zona pelúcida (cabeça de seta) dos animais controles. PAS. Bar=20µm.

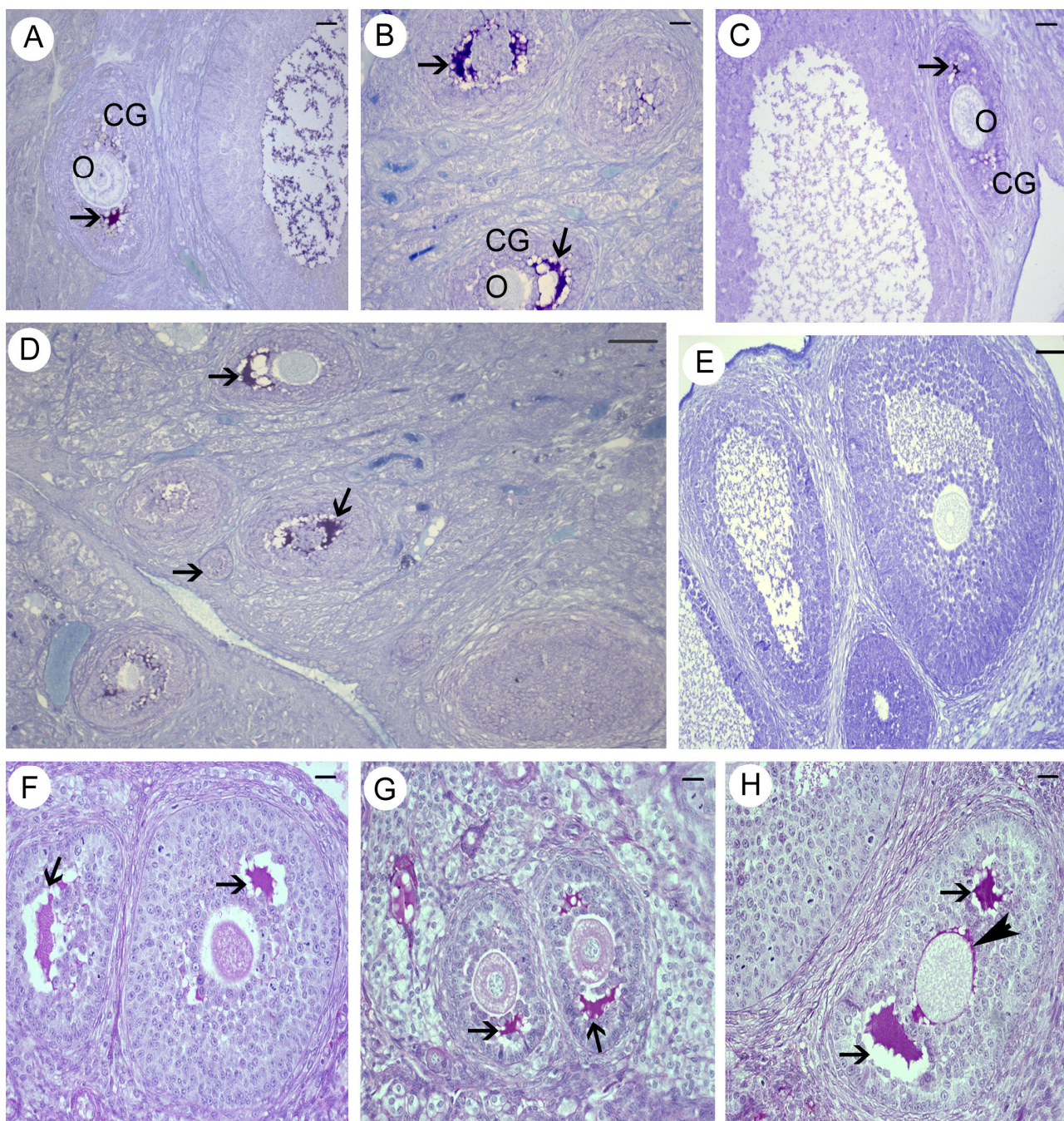


Figura 5. Fotomicrografia dos folículos e corpos lúteos dos animais UChA, UChB e controle.

- A) Reação com PAS na zona pelúcida de folículos no grupo UChA (seta). CG: camada granulosa; A: antro; O: ovócito; CO: cumulus oophorus. PAS. Bar=20µm.
- B) Reação com PAS na zona pelúcida de folículos no grupo controle (seta). CG: camada granulosa; A: antro; O: ovócito. PAS. Bar=50µm.
- C) Reação com fosfatase ácida no corpo lúteo (cabeça de seta) e camada granulosa (seta) do grupo UChA. A: antro folicular. Fosfatase Ácida. Bar=20µm.
- D) Destaque para reação com fosfatase ácida na camada granulosa (seta) de folículo antral do grupo UChB. A: antro. Fosfatase Ácida. Bar=20µm.
- E) Ausência de reação à fosfatase ácida na camada granulosa (seta) de folículo do grupo controle. A: antro. Fosfatase Ácida. Bar=20µm.
- F) Reações com fosfatase ácida esparsas na camada granulosa de folículo em crescimento (seta) e grumos associados no corpo lúteo dos animais UChA (cabeça de seta). Fosfatase Ácida. Bar=50µm.
- G) Intensa reação à fosfatase ácida em folículo antral dos animais UChB (seta). A: antro; CL: corpo lúteo. Fosfatase Ácida. Bar=50µm.
- H) Reações isoladas com fosfatase ácida no corpo lúteo (cabeça de seta) e na periferia da camada granulosa (seta) de folículo em crescimento do grupo UChB. Fosfatase Ácida. Bar=50µm.

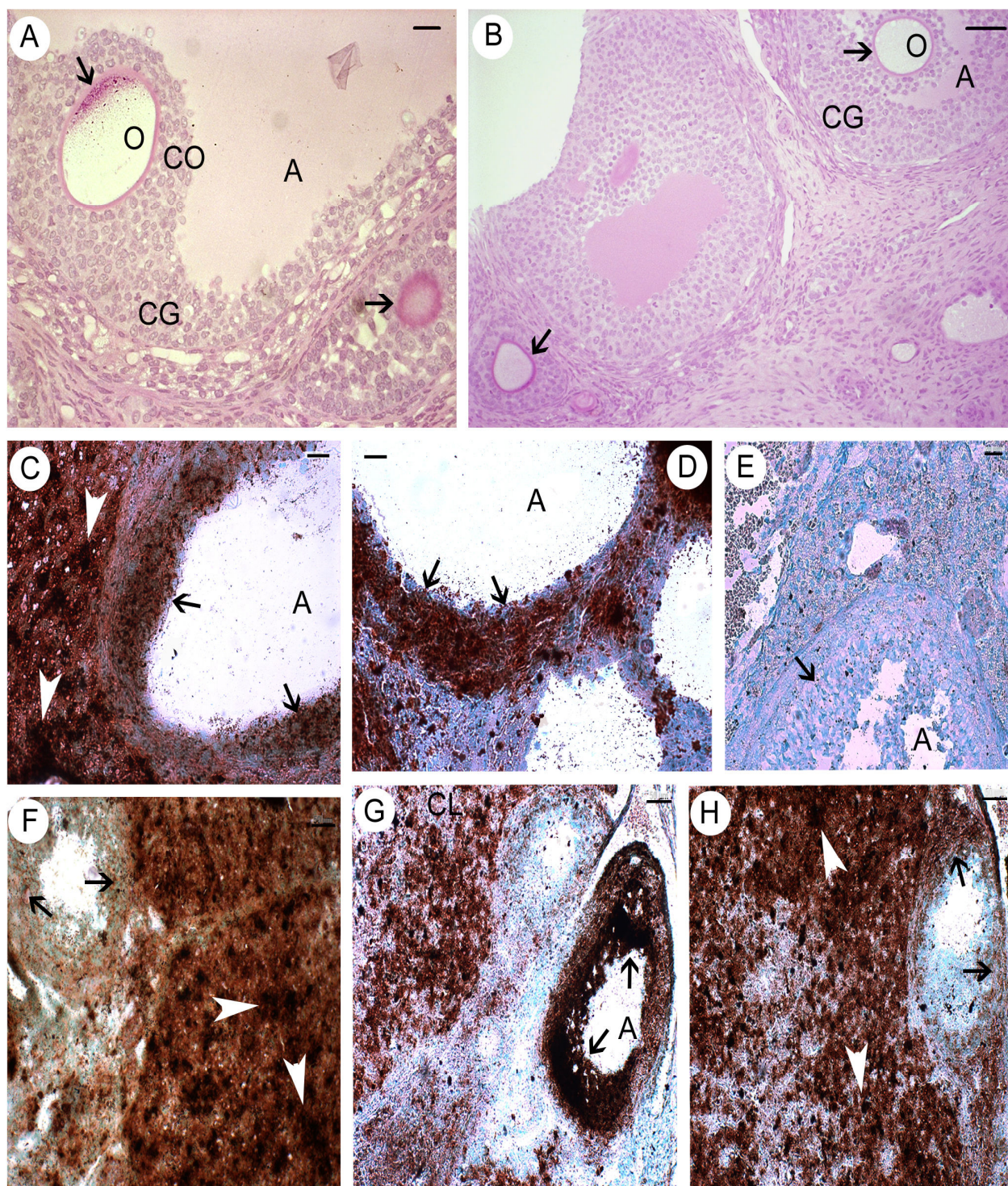


Figura 6. Fotomicrografia dos folículos e região medular dos grupos UChA, UChB e controle.

- A) Reação com fosfatase alcalina na teca interna de folículo de crescimento (cabeça de seta) e antral (seta) no grupo UChA. A: antro; CL: corpo lúteo. Fosfatase Alcalina. Bar=50µm.
- B) Reação intensa com fosfatase alcalina em folículos de crescimento (seta) no grupo UChB. CL: corpo lúteo. Fosfatase Alcalina. Bar=50µm.
- C) Baixa intensidade de reação à fosfatase alcalina em folículos de crescimento (seta) no grupo controle. A: antro. Fosfatase Alcalina. Bar=50µm.
- D) Folículos de crescimento do grupo UChB, evidenciando forte reação à fosfatase alcalina (seta). CG: camada granulosa. Fosfatase Alcalina. Bar=20µm.
- E) Folículo preantral com teca interna pouco marcada pela reação à fosfatase alcalina no grupo controle (seta). CG: camada granulosa; A: antro; O: ovócito. Fosfatase Alcalina. Bar=20µm.
- F) Medula ovariana fibrocelular dos animais controles (*). TGI: tecido glandular intersticial; VS: vaso sanguíneo. Tricrômico de Masson. Bar=50µm.
- G) Medula ovariana com massas de tecido glandular intersticial dispersas no estroma (TGI) das ratas UChB. VS: vaso sanguíneo. Tricrômico de Masson. Bar=50µm.

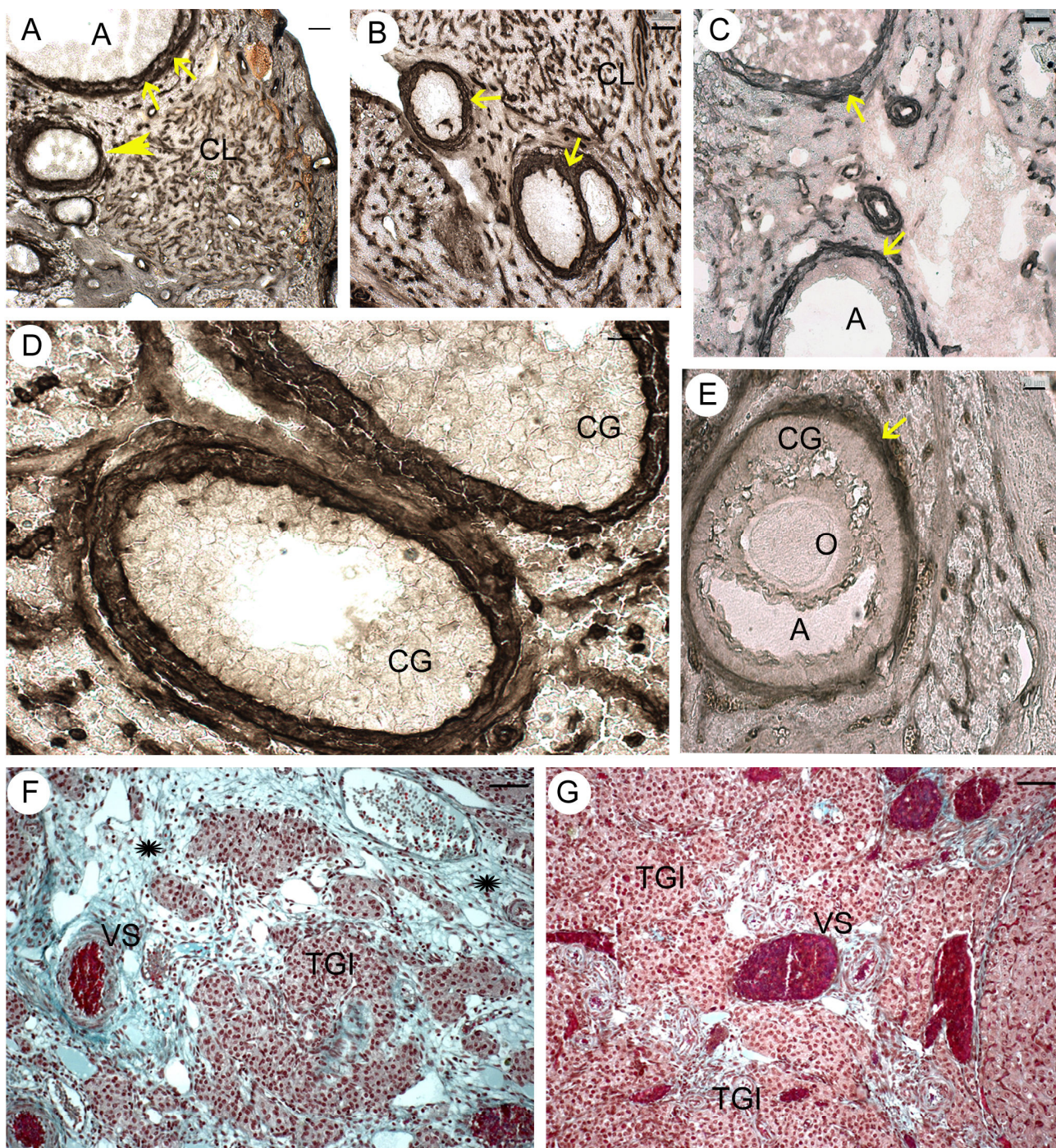


Figura 7. Fotomicrografia do estroma e medula ovariana dos animais UChA, UChB e controle.

- A) Reações PAS positiva na porção secretora das glândulas intersticiais do estroma ovariano no grupo UChA (seta). CG: camada granulosa; V.S: vaso sanguíneo. PAS. Bar=50µm.
- B) Reação acentuada com PAS na porção secretora glandular do grupo UChB (seta). São destacados o núcleo esférico e o citoplasma vacuolizado (*). PAS. Bar=20µm.
- C) Reações com PAS pouco intensa nas glândulas do grupo controle (seta). FS: folículo secundário. PAS. Bar=20µm.
- D) Metacromasia em mastócitos presentes na medula do ovário (seta) do grupo UChA. Destaque para a reação metacromática nos grânulos em extrusão. Azul de Toluidina. Bar=20µm e 10µm, respectivamente.
- E) Atividade mastocitária na região medular do ovário das ratas UChA (seta). AR: artérias. Giemsa. Bar=20µm.
- F) Vascularização da medula estromal no grupo UChA. Fosfatase Alcalina. Bar=50µm.
- G) Vascularização da medula no grupo UChB. Fosfatase Alcalina. Bar=50µm.

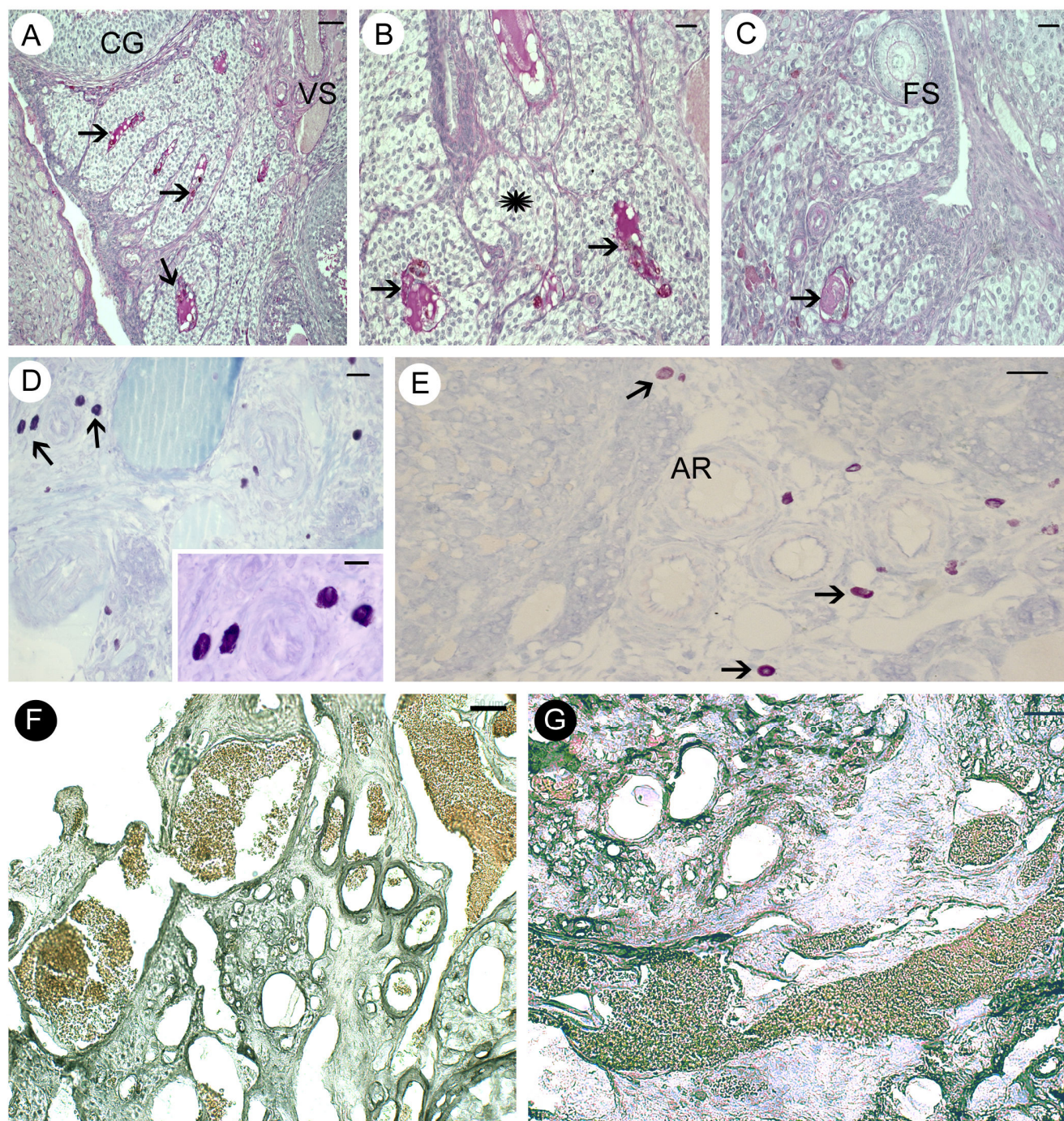


Figura 8. Fotomicrografia do corpo lúteo dos animais UChA, UChB e controle.

- A) Intensa reação com fosfatase ácida no corpo lúteo do grupo UChA, com formação de grumos associados (cabeça de seta). Fosfatase Ácida. Bar=20µm.
- B) Moderada reação com fosfatase ácida no corpo lúteo do grupo UChB, com destaque para alguns sítios de reações (cabeça de seta). Fosfatase Ácida. Bar=20µm.
- C) Pouca reação com fosfatase ácida no corpo lúteo do grupo controle (cabeça de seta). Fosfatase Ácida. Bar=20µm.
- D) Reação com fosfatase alcalina (seta) mostrando vascularização no corpo lúteo das ratas UChA. Fosfatase Alcalina. Bar=20µm.
- E) Elevada reação com fosfatase alcalina (seta) no corpo lúteo dos animais UChB. Fosfatase Alcalina. Bar=20µm.
- F) Pouca reação com fosfatase alcalina (seta) no corpo lúteo dos animais controles. Fosfatase Alcalina. Bar=20µm.
- G) Infiltrado macrofágico (seta) presente entre as células luteínicas (cabeça de seta) nos animais UChA. Note o núcleo excêntrico e o citoplasma eosinofílico. VS: vaso sanguíneo. HE. Bar=20µm.
- H) Alguns macrófagos (seta) presentes no tecido lúteo das ratas UChB. Note alguns vacúolos autofágicos no citoplasma. VS: vaso sanguíneo. L: leucócitos. HE. Bar=20µm.
- I) Poucos macrófagos (seta) dispersos no corpo lúteo das ratas controles. VS: vaso sanguíneo. L: leucócitos. HE. Bar=20µm.

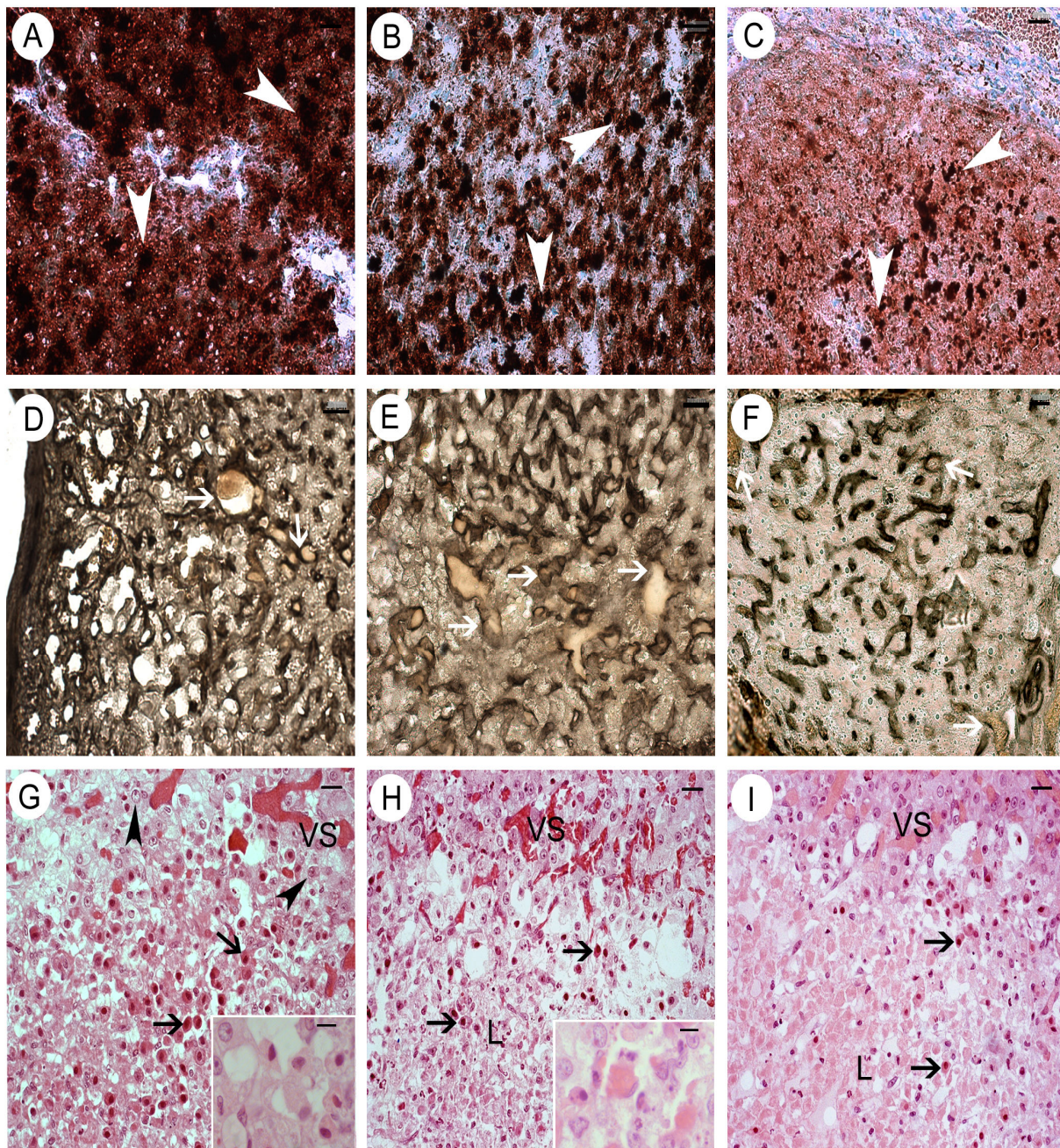


Figura 9. Eletromicrografia dos folículos de crescimento dos animais UCh e controle.

- A) Células da granulosa de folículos do grupo UChA com mitocôndrias edemaciadas (seta) no citoplasma. N: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso. MET. Bar=0,43µm.
- B) Célula da granulosa do grupo UChB com presença de vacúolos (seta) dispersos no citoplasma. M: mitocôndria; N: núcleo; REL: retículo endoplasmático liso. MET. Bar=0,43µm.
- C) Núcleos com condensação da cromatina e citoplasma escasso nas células da granulosa dos animais UChB. GL: gota lipídica; Fc: fibras colágenas. MET. Bar=0,59µm.
- D) Células da granulosa do grupo controle, evidenciando núcleos íntegros (N) e sistema reticular desenvolvido (*). M: mitocôndria; CG: complexo de Golgi. MET. Bar=0,75µm.
- E) Lâmina basal (seta), marcando a zona de transição entre a camada granulosa (CG) e a teca interna (TI) nos animais UChA. N: núcleo; M: mitocôndria. MET. Bar=1,03µm.
- F) Lâmina basal (seta) do grupo UChB. N: núcleo; M: mitocôndria. MET. Bar=1,29µm.
- G) Lâmina basal (seta) do grupo controle. N: núcleo; M: mitocôndria. MET. Bar=0,43µm.
- H) Teca interna com citoplasma carregado de gotas lipídicas (GL) no grupo UChA. N: núcleo; TE: teca externa. MET. Bar=0,51µm.
- I) Teca interna com citoplasma carregado de gotas lipídicas (GL) no grupo UChB. N: núcleo. MET. Bar=0,61µm.

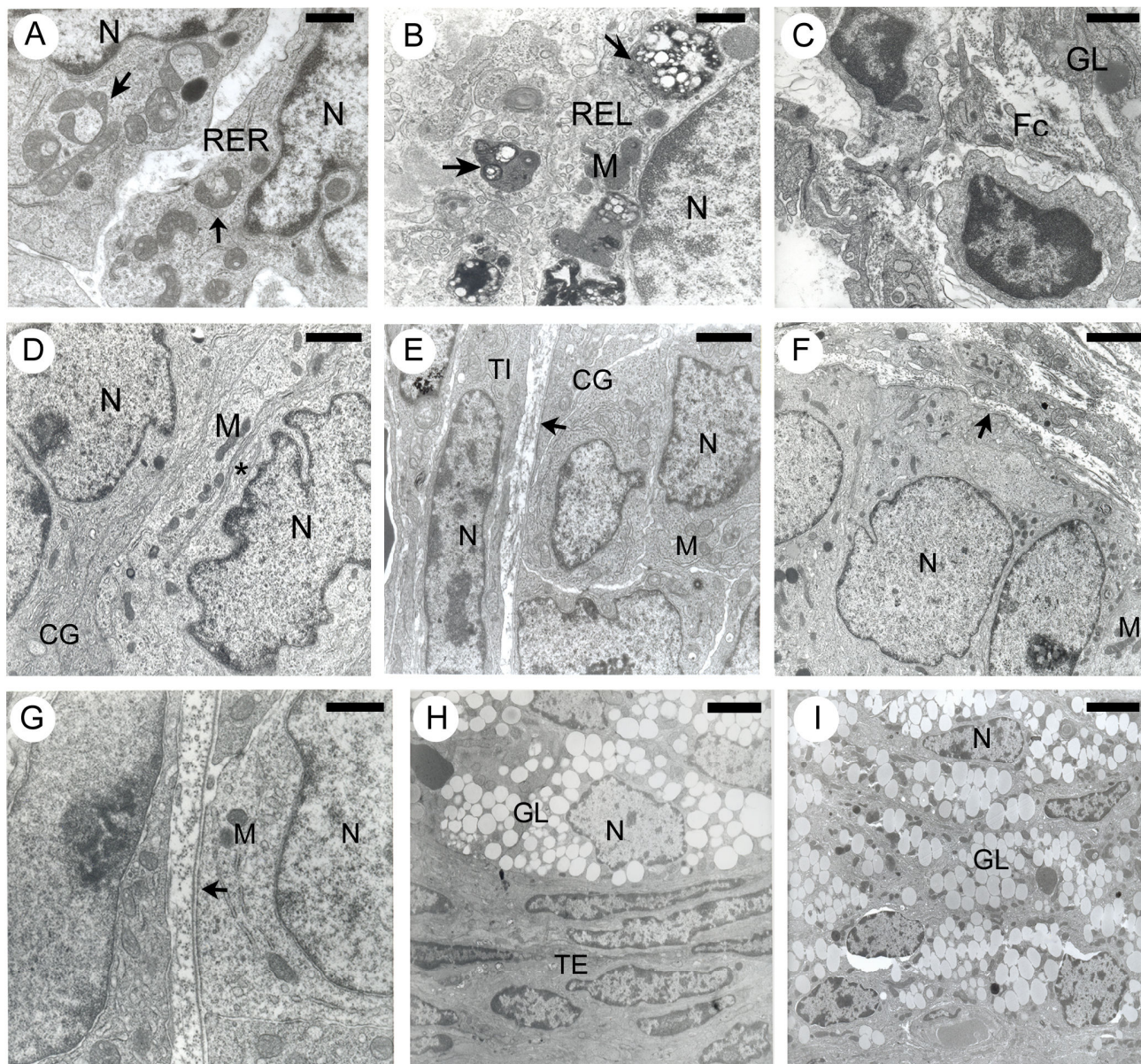


Figura 10. Eletromicrografia dos folículos de crescimento dos animais UCh e controle.

- A) Citoplasma de ovócito dos animais UChA contendo pequenos grânulos de secreção (seta) com material mais e menos elétron-denso. M: mitocôndria; ZP: zona pelúcida; RER: retículo endoplasmático rugoso. MET. Bar=0,59µm.
- B) Citoplasma de ovócito dos animais UChB contendo grandes grânulos de secreção (seta) com material heterogêneo. M: mitocôndria; ZP: zona pelúcida; RER: retículo endoplasmático rugoso; Mv: microvilos. MET. Bar=0,43µm.
- C) Citoplasma de ovócito dos animais controles. M: mitocôndria; RER: retículo endoplasmático rugoso. MET. Bar=0,59µm.
- D) Ovócito de folículo em crescimento do grupo UChB com núcleo eucromático (N) e associação à *corona radiata* através da zona pelúcida (seta). CG: célula da granulosa; ZP: zona pelúcida. MET. Bar=5,55µm.

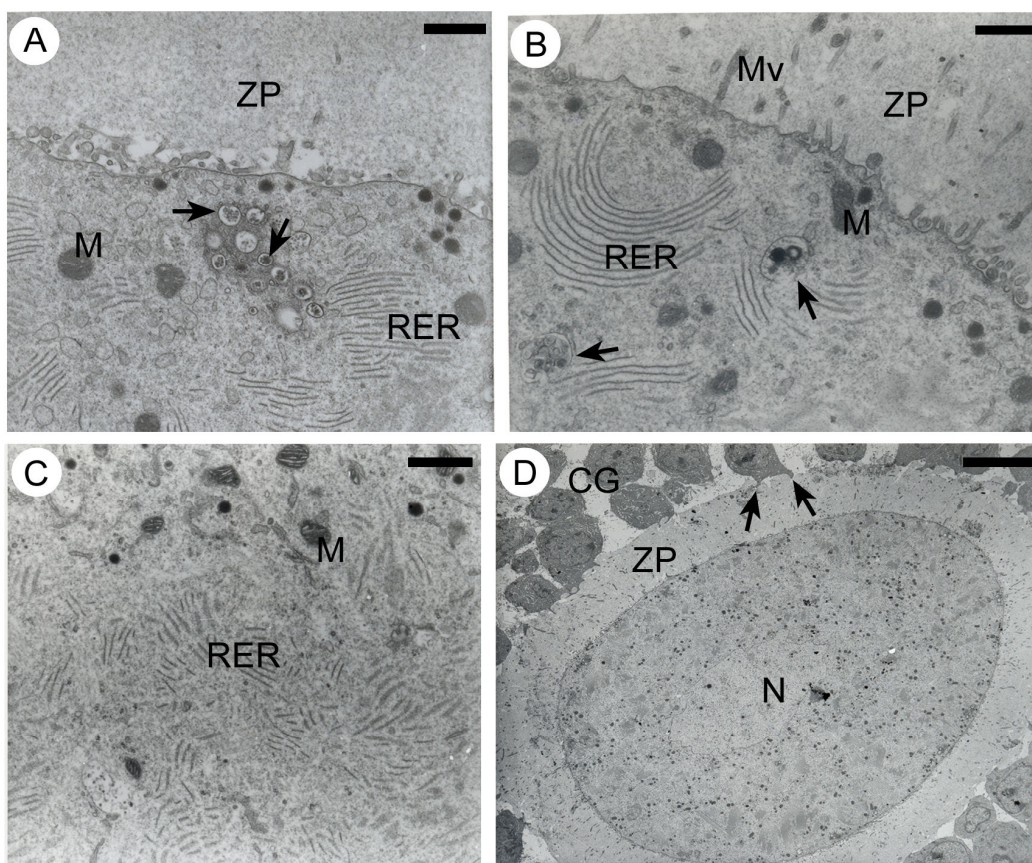
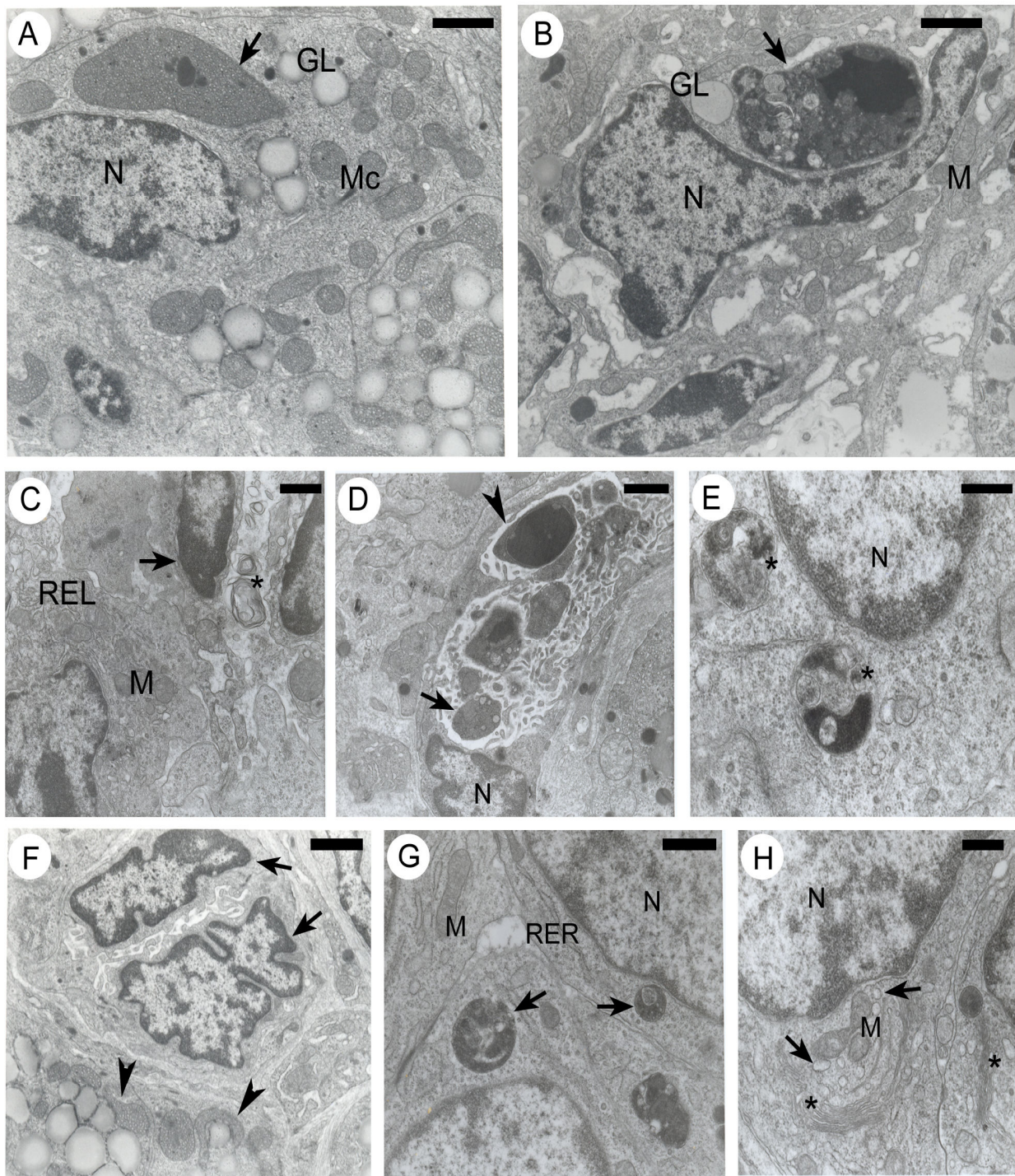


Figura 11. Eletromicrografia das células estromais e corpo lúteo dos animais UCh e controle.

- A) Célula da glândula intersticial com característica secretora no grupo UChA. Note a mitocôndria gigante (seta) próximo ao núcleo (N). GL: gota lipídica; Mc: mitocôndria com crista tubular. MET. Bar=0,75µm.
- B) Célula da glândula intersticial do grupo UChB exibindo núcleo irregular (N) com grande vacúolo citoplasmático sugerindo um fagolisossomo (seta). M: mitocôndria; GL: gota lipídica. MET. Bar=0,75µm.
- C) Célula luteínica com condensação da cromatina nuclear (seta) e presença de corpos multilamelares (*) no grupo UChA. M: mitocôndria; REL: retículo endoplasmático liso. MET. Bar=0,59µm.
- D) Célula presente no corpo lúteo dos animais UChA com citoplasma carregado de vacúolos de tamanhos variados, contendo material pouco (seta) ou bastante eletrônico (cabeça de seta). N: núcleo. MET. Bar=0,75µm.
- E) Célula luteínica do grupo UChA com núcleo regular (N) e vacúolos digestivos no citoplasma (*). MET. Bar=0,24µm.
- F) Célula luteínica do grupo UChB evidenciando núcleos com chanfraduras e cromatina na periferia (seta). Note as mitocôndrias com crista tubular associadas a gotas lipídicas (cabeça de seta). MET. Bar=0,75µm.
- G) Célula luteínica do grupo UChB com vacúolos citoplasmáticos de tamanho e conteúdo digestivo variados (seta). M: mitocôndria; RER: retículo endoplasmático rugoso; N: núcleo. MET. Bar=0,43µm.
- H) Célula luteínica do grupo controle com característica secretora, destacando o complexo de Golgi organizado (*) e o trânsito de vesículas (seta). N: núcleo; M: mitocôndria. MET. Bar=0,32µm.



CONCLUSÕES FINAIS

Conclui-se que há irregularidades do ciclo estral nas linhagens UCh e alterações estruturais e biométricas do tecido ovariano na fase de estro do ciclo estral, podendo o etanol interferir na fisiologia ovariana de forma direta ou através do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, R.A. Clinically important effects of alcohol on endocrine function. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.74, p.957-960, 1992.

ALBERTINI, D.F., COMBELLES, C.M., BENECHCHI, E., et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-653, 2001.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. How many women get ovarian cancer. Disponível em: http://www.cancer.org/eprise/main/docroot/CRI/CRI_2x?sitearea=CRI&dt=33. Acesso em: 18 de janeiro de 2007.

ANDERSON, R.A., QUIGG, J.R., OSWALD, C., et al. Demonstration of a functional blood-testis barrier to acetaldehyde. Evidence for lack of acetaldehyde effect on ethanol-induced depression of testosterone in vivo. **Biochemical Pharmacol.**, v.34(5), p.685-695, 1985.

BAGNARDI, V., BLANGIARDO, M., LA VECCHIA, C. Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. **Alcohol Res. Health.**, v.25(4), p.263-270, 2001.

BAI, W., OLIVEROS-SAUNDERS, B., WANG, Q. et al. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v.36(10), p.657-666, 2000.

BANDERA, C.A., CRAMER, D.A., FRIEDMAN, A.J. et al. Fertility therapy in the setting of a history of invasive epithelial ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v.58, p.116-118, 1995.

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

- BARR, R.W., SOMMERS, S.C. Endocrine abnormalities accompanying hepatic cirrhosis and hepatoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.17, p.1017-1029, 1957.
- BASELT, R.C. Disposition of alcohol in man. *In*: GARRIOT, J.C. (Ed) *Medicolegal aspects of alcohol*. Tucson: Lawyers & Judges, 1996. Cap. 3, p. 65-78.
- BECKER, U., TONANENSEN, H., KAAS-CLISSON, N., et al. Menstrual disturbances and alcoholic women. **Drug Alcohol Depend.**, v.24, p.75-82, 1989.
- BENNETT, H.S., BAGGENSTOSS, A.H., BUTT, H.R. The testes, breast and prostate of men who die of cirrhosis of the liver. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.20, p.814, 1950.
- BLOMQVIST, O., ENGEL, J.A., NISSBRANDT, H. et al. The mesolimbic dopamine-activating properties of ethanol are antagonized by mecamylamine. **Eur. J. Pharmacol.**, v.249, p.207, 1993.
- BO, W.J., KRUEGER, W.A., RUDEEN, P.K. et al. Ethanol-induced alterations in the morphology and function of the rat ovary. **Anat. Rec.**, v.202, p.255-260, 1982.
- BORHANMANESH, F., HAGHIGHI, P. Pregnancy in patients with cirrhosis of the liver. **Obstet. Gynecol.**, v.36, p. 315-324, 1970.
- BOYDEN, T.W., PAMENTER, R.W. Effects of ethanol on the male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Endocr. Rev.**, v.4(4), p.389-395, 1983.
- BUFFUM, J. Pharmacosexology: The effects of drugs on sexual function: a review. **J. Psychoactive Drugs.**, v.14, p.5-44, 1983.
- BURNS, K.H., MATZUK, M.M. Minireview: genetic models for the study of gonadotropin action. **Endocrinology**, v.143, p.2823-2835, 2002.

CASTRO, G.D., CASTRO, C.R., MACIEL, M.E., et al. Ethanol-induced oxidative stress and acetaldehyde formation in rat mammary tissue: potential factors involved in alcohol drinking promotion of breast cancer. **Toxicology**, v.219(1-3), p.208-219, 2006.

CELIK, C., GEZGINÇ, K., AKTAN, M., et al. Effects of ovulation induction on ovarian morphology: an animal study. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v.14, p.600-606, 2004.

CHAUDHURI, J.D. Alcohol and developing fetus: a review. **Med. Sci Monit.**, v.6(5), p.1031-1041, 2000.

CHIAO, Y.B., VAN THIEL, D.H. Biochemical mechanisms that contribute to alcohol-induced hypogonadism in the male. **Alcoholism: Clin. Exp. Res.**, v.7(2), p.131-134, 1983.

CÍCERO, T.J. Alcohol-induced deficits in the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis in the male. **Alcoholism: Clin. Exp. Res.**, v.6, p.207-215, 1982.

CLARKE, P.B.S., FU, D.S., JAKUBOVIC, A. Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.246, p.701, 1988.

COBB, C.F., GAVALER, J.S., VAN THIEL, D.H. Is ethanol a testicular toxin? **Clin. Toxicol.**, v.18(2), p.149-154, 1981.

DEANE, H.W., LOBEL, B.L., ROMNEY, S.L. Enzymatic histochemistry of normal human ovaries of the menstrual cycle, pregnancy and the early puerperium. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.83, p.281-294, 1962.

EDMAN, C.D., MACDONALD, P.C. Origin of estrogen in a postmenopausal woman with a nonendocrine tumor of the ovary and endometrial hyperplasia. **Obstet. Gynecol.**, v.47(6), p.644-650, 1976.

EDWARDS, G., MARSHALL, E.J., COOK, C.C.H. O tratamento do alcoolismo: **Um Guia para Profissionais da Saúde**. 3ª edição. Porto Alegre (RS): Artes Médicas, 1999.

ESPEY, L.L., RICHARDS, J.S. Ovulation. *In*: NEILL, J.D. **Physiology of Reproduction**. Texas: Elsevier, p.425-458, 2006.

FATHALLA, M.F. Incessant ovulation a factor in ovarian neoplasia. **Lancet**, v.2, p.163, 1971.

FIGUEIRA, I., LETA, J., DE MEIS, L. Evaluating the scientific production among the main brazilian psychiatric journal from 1981 to 1995. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.21(4), p.201-208, 1999.

FORCHHEIMER, M., CUNNINGHAM, R.M., GATER, D.R., et al. The relationship of blood alcohol concentration to impairment severity in spinal cord injury. **J. Spinal Cord Med.**, v.28(4), p.303-307, 2005.

FREZZA, M., PADOVA, C., POZZATO, G., et al. High blood levels in women: role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first pass metabolism. **N. Engl. J. Med.**, v.322, p.95-99, 1990.

FRISCH, R.E., MacARTHUR, J.W. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. **Science**, v.185, p.949-951, 1974.

GARRO, A.J., LIEBER, C.S. Alcohol and cancer. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.30, p.219-249, 1990.

GIACHETI, L.M. Cresce o número de mulheres alcoólatras. **Jornal da Cidade**, Bauru, 01 dez, p.14, 1996.

GRAVES, P.E., SALHANICK, H.A. Stereoselective inhibition of aromatase by enantiomers of aminoglutethimide. **Endocrinology**, v.105, p.52-57, 1979.

GREEN, P., RUBIN, L. Amenorrhea as a manifestation of chronic liver disease. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.58, p.141-146, 1959.

GRENHOFF, J., ASTON-JONES, G., SVENSSON, T.H. Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. **Acta Physiol. Scand.**, v.128, p.351, 1986.

HARLAP, S., SHIONO, P.H. Alcohol, smoking and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. **Lancet**, v.26(2), p.173-176, 1980.

HASHIMOTO, T., MIYAIK, K., ISUMI, K.Y. Effect of clomiphene citrate on basal and LRH- induced gonadotropin secretion in post-menopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.42, p.593-594, 1976.

HENDERSON, G.I., SCHENKER, S. The effect of maternal alcohol consumption on the viability and visceral development of the newborn rat. **Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol.**, v.16, p.15-32, 1977.

HIRATA, E.S., HIRATA, L.C.M. Bioquímica e metabolismo do etanol. *In*: FORTES, J. R. A.; CARDO, W.N. **Alcoolismo: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, p. 57-64, 1991.

HOYME, H.E., MAY, P.A., KALBERG, W.O., et al. A practical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders. **Pediatrics.**, v.115(1), p.39-47, 2005.

HUGUES, J.N., COSTE, T., PERRET, G., et al. Hypothalamo-pituitary ovarian function in thirty-one women with chronic alcoholism. **Clinical Endocrinol.**, v.12, p.543-551, 1980.

JOHNSON, B.A., AIT-DAOUD, N., DICLEMENTE, C.C., et al. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomized controlled trial. **Lancet.**, v.361, p.1677-1685, 2003.

KESMODEL, U., WISBORG, K., OLSEN, S.F., et al. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. **Alcohol Alcohol.**, v.37, p.87-92, 2002.

KOOB, G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.13, p.177, 1992.

KORSTEN, M.A., LIEBER, C. Nutrição no alcoólico. **Med. Clin. N. Am.**, Lawrence, v.63, p.963-672, 1979.

KRUEGER, W.A., BO, W.J., RUDEEN, P.K. Female reproduction during chronic ethanol consumption in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.17, p.629-631, 1982.

KRULEWITCH, C.J. Alcohol consumption during pregnancy. **Annu Rev Nurs Res.**, v.23, p.101-134, 2005.

LARANJEIRA, R.R. Manual de psiquiatria. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1996.

LAURA, I.A., MARTINEZ, M., PADOVANI, C.R., et al. Ultrastructural and morphometric analysis on the ovary of Wistar rats after chronic ethanol ingestion. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.35, p.167-176, 2003.

LEE DEES, W.O., SRIVASTAVA, V.K., HINEY, J.K. Alcohol and female puberty: the role of intraovarian systems. **Alcohol Res. Health.**, v.25, p.271, 2001.

LI, T.K., LUMENG, L., McBRIDE, W.J., MUYPHI, J.M. Rodent lines selected for factors affecting alcohol solution. **Alcohol Alcohol.**, v. 1, n. 2, p. 91-96, 1987.

LIEBER, C.S., DE CARLI, L.M. Ethanol dependence and tolerance: a nutritionally controlled experimental model in the rat. **Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol.**, v.6(3), p.983-991, 1973.

LINQUETTE, M., GASNAULT, J.P., HOUCKE, M. Etude histologique des ovaires chez 8 cirrhotiques. **Revue Française de Gynécologie**, v.67, p.385-396, 1972.

MAPOLES, J.E., IWAHASHI, M., LUCAS, D., et al. Acetaldehyde exposure causes growth inhibition in a Chinese hamster ovary cell line that expresses alcohol dehydrogenase. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.18(3), p.632-639, 1994.

MELLO, N.K., BREE, M.P., MENDELSON, J.H. Alcohol self-administration disrupts reproductive function in female Macaque Monkeys. **Science**, v.221 p.677-679, 1983.

MENDELSON, J.H., MELLO, N.K., ELLINGBOE, J. Acute alcohol intake and pituitary gonadal hormones in normal human females. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.218, p.23-26, 1981.

MONOSKI, M., NUDELL, D.M., LIPSHULTZ, L.I. Effects of medical therapy, alcohol, and smoking on male fertility. **Contemp. Urol.**, p.57-63, 2002.

MORGAN, M.Y. Sex and alcohol. **Br. Med. Bull.**, v.38, p.43-48, 1982.

MORRIONE, T. The effect of estrogen on the testes in hepatic insufficiency. **Arch. Pathol.**, v.37, p.39, 1944.

MOSELHY, H.F., GEORGIU, G., KAHN, A. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. **Alcohol Alcohol.**, v.36, p.357-368, 2001.

NANJI, A.A., HILLER-STURMHOFEL, S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. **Alcohol Health Res. World**, v.21, p.325-330, 1997.

O'CONNELL, H., LAWLOR, B.A. Recent alcohol intake and suicidality- a neuropsychological perspective. **Ir J Med Sci.**, v.174(4), p.51-54, 2005.

O'MALLEY, S., JAFFE, A., CHANG, G., et al. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence: a controlled study. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.16, p.362, 1992.

PETERS, H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. **Acta. Endocrinol.**, v.62, p.98-116, 1969.

POSCHL, G., SEITZ, H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol.**, v.39, p.155-165, 2004.

PRIEDKALNS, J., LEISER, R. Female reproductive system. *In*: DELLMANN, H.D., EURELL, J. **Veterinary histology**, p.247-269, 1998.

PUROHIT, V. Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. **Alcohol.**, v. 22(3), p.123-127, 2000.

RANKIN, T., FAMILARI, M., LEE, E., et al. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. **Development**, v.122, p.2903-2910, 1996.

RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocr. Rev.**, v.15, p.725-751, 1994.

RICHARDSON, G.S. Hormonal physiology of the ovary. *In*: BOLD, J.J. **Gynecologic Endocrinology**, p.55-77, 1975.

RILEY, E.P., THOMAS, J.D., GOODLETT, C.R., et al. Fetal alcohol effects: mechanisms and treatment. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 25, p.110-116, 2001.

ROISMAN, I., LIFSHITZ, I. Alcohol: a risk factor for breast cancer. **Harefuah.**, v.145(1), p.39-41, 2006.

- SALONEN, I., PAKARINEN, P., HUHTANIEMI, I. Effect of chronic ethanol diet in expression of gonadotropin genes in the male rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.260, p.463-467, 1992.
- SHUSHAN, A., PALTIEL, O., SCHENKER, G.J. Induction of ovulation and borderline ovarian cancer – the hormonal connection? **Eur J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.85, p.71-74, 1999.
- SPANAGEL, R., HOLTER, S.M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. **J. Neural Transm.**, v.107, p.669-680, 2000.
- SWIFT, R.M., DAVIDSON, D., WHELIHAN, W., et al. Ondansetron alters human alcohol intoxication. **Biol Psychiatry**, v.40, p.514-521, 1996.
- TABAKOFF, B., HOFFMAN, P.L. Animal models in alcohol research. **Alcohol Res. Health**, v.24(2), p.77-84, 2000.
- TADIC, S.D., ELM, M.S., SUBBOTIN, V.M., et al. Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. **Hepatology**, v.31, p.1135-1140, 2000.
- TAMPIER, L., QUINTANILLA, M.E., MARDONES, J. Acetaldehyde metabolism: differences between UChA and UChB rats. **Alcohol Alcohol.**, v.29, p.751-755, 1994.
- VALIMAKI, M., HARKONEN, M., YLIKAHRI, R. Acute effects of alcohol on female sex hormones. **Alcoholism Clin. Exp. Res.**, v.7, p.289-293, 1983.
- VAN THIEL, D.H., LESTER, R., SHERINS, R.J. Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. **Gastroenterology**, v.67, p.1188-1199, 1974.
- WISE, R.A., ROMPRE, P.P. Brain dopamine and reward. **Annu. Rev. Psychol.**, v.40, p.191, 1989.

YEN, S.S.C., JAFFE, R.B., eds. Reproductive Endocrinology, third edition. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1991.

DECLARAÇÃO

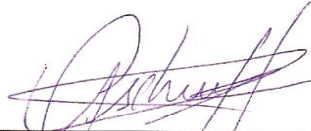
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada: "Estrutura e Biometria do ovário de ratas adultas UChA e UChB (consumidoras voluntárias de etanol)".

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 84/07-CEEA-IBB/UNESP).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno(a): Luiz Gustavo de Almeida Chuffa



Orientador(a): Dr. Francisco Eduardo Martinez

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO

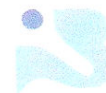
Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/IB - UNICAMP



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **84/07-CEEA**, sobre "*ESTRUTURA E BIOMETRIA DO OVÁRIO DE RATAS UCHA E UCHB (BEBEDORAS VOLUNTÁRIAS DE ETANOL)*", sob a responsabilidade de **FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de 14/12/2007.

Botucatu, 14 de dezembro de 2007.



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



NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA