

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E DO ALCOOLISMO NO EPIDÍDIMO DE
RATOS UCh (BEBEDOR VOLUNTÁRIO DE ETANOL A 10%)

GIOVANA RANPAZZO TEIXEIRA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, *Campus* de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em Biologia
Geral e Aplicada**

BOTUCATU - SP
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E DO ALCOOLISMO NO EPIDÍDIMO DE
RATOS UCh (BEBEDOR VOLUNTÁRIO DE ETANOL A 10%)

GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA

FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ

(Orientador)

PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO

(Co-Orientadora)

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, *Campus* de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em Biologia
Geral e Aplicada**

BOTUCATU - SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Teixeira, Giovana Rampazzo.

Efeitos da separação materna e do alcoolismo no epidídimo de ratos UCh
(bebedor voluntário de etanol a 10%) / Giovana Rampazzo Teixeira. –
Botucatu: [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Co-Orientadora: Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Assunto CAPES: 20100000

1. Reprodução - Efeitos das drogas - Estudos experimentais

CDD 599.016

Palavras-chave: Alcoolismo crônico; Epidídimo; Estresse; Separação materna;
UCh

Dedicatória

“Feliz a alma que teme ao Senhor. Os olhos do Senhor estão voltados para aqueles que o temem; pois ele é um poderoso protetor, um sólido apoio, um abrigo contra o calor, uma tela contra o ardor do meio-dia, um sustentáculo contra os choques, um amparo contra a queda. Ele eleva a alma, ilumina os olhos; dá saúde, vida e benção” (Eclo 34,17-20)

Primeiramente a Deus, Jesus e Maria nossa mãe...

Por conduzir os meus passos, me carregar no colo nos momentos que mais precisei e principalmente pelo Amor intensamente derramado.

Aos meus pais Osmar de Assim Teixeira e Maura I.

Rampazzo Teixeira...

A minha eterna gratidão pelo incansável incentivo, por acreditar nos meus sonhos e apoiar minhas decisões.

Ao meu namorado Fernando Roberto Catussi...

Agradeço pelo amor intenso e sereno que é compartilhado, e pela cumplicidade de todos os momentos vividos, pela sua dedicação amorosa seus cuidados e sua compreensão pelos momentos ausentes.

Aos meus irmãos Junior Rampazzo Teixeira e Maria Isabel

Rampazzo Teixeira...

Pela amizade e companheirismo.

Dedico a essas pessoas maravilhosas esse trabalho

Giovana Rampazzo Teixeira

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Orientador Francisco Eduardo Martinez

Que transcendeu o seu papel de orientador, semeando idéias e me conduzindo por caminhos nunca dantes trilhados. Agradeço pela acolhida, pelo respeito, por acreditar nos meus ideais que resultou em uma bela parceria. Será sempre uma referencia para minha existência profissional e pessoal.

A Prof^a. Dr^a. Co-Orientadora Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

A você que sempre foi um exemplo de superação, garra, sabedoria, sensibilidade, dentre tantas outras qualidades, mas acima de tudo me apoiou nos momentos decisivos, obrigado por ficar sempre por perto, pelas palavras confortantes, por acreditar em mim.

Aos Amigos Prof. Dr. Otávio Augusto Martins e Prof. Ms. Rafael Kremer

Foram momentos ímpar, marcados pelo resto de minha vida, desde o acadêmico até o mais descontraído. Vocês foram imprescindíveis na elaboração, execução e finalização desse projeto.

Ao Prof. Wilson de Mello Junior

Os meus agradecimentos pelo incentivo, ensinamentos, exemplo de competência e amizade, o meu respeito incondicional.

A Prof^a. Dr. Raquel Fantin Domeniconi e Prof. Dr. Sérgio Pereira

A minha gratidão e reconhecimento pela disponibilidade e dedicação.

Ao auxiliar acadêmico Gelson Rodrigues do Departamento de Anatomia IBB/UNESP pelo auxilio e amizade durante todos os momentos de rotina e processamento dos materiais.

Ao servidor público Wanderley Thiago da Silva (Biotério Central) pelos auxílios durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao pós graduando Luiz Gustavo de Almeida Chuffa por toda contribuição e amizade.

Aos estagiários, Edgar V. Oliveira, Henrique K. Roffato, André E. B. Camargo pela ajuda durante o experimento e amizade.

A todos os professores do Departamento de Educação Física FCT/UNESP de presidente prudente pelo incentivo, ensinamentos, e toda colaboração para que eu pudesse chegar até esse momento. A professora Olga Cristina de Mello Malheiro por ter contribuído diretamente na minha formação e ao Laboratório Experimental de Atividade Física (LEAF) pela oportunidade de aprender e desenvolver projetos decisivos na minha formação.

Ao grupo de estudo Biologia da Reprodução e todos os membros que dele participam – Departamento de Anatomia IBB/UNESP, por todas as contribuições na execução do projeto.

A professora Wilma de Grava Kempinas por toda a contribuição dada ao projeto e principalmente por ceder as instalações do laboratório Reprotóx para processamento de parte do material.

Ao José Eduardo, técnico do laboratório de rotina em embriologia, pela amizade e ajuda para esse projeto.

As secretárias do Departamento de Anatomia Jerusa Verpa, Cleuza Andrade Freitas e Jackeline Vieira por todo o auxílio e contribuição.

Aos secretários da seção de Pós-Graduação por todo o trabalho empregado para a execução dos parâmetros burocráticos.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia Paulo Sérgio da Silva e Luciano Alves da Cunha, pelo incentivo e ensinamentos nas aulas de anatomia.

Ao programa de pós-graduação Biologia Geral Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Aos professores do Programa de Biologia Geral e Aplicada pela aprendizagem e incentivo.

Aos amigos do programa de pós-graduação pelo auxílio prestado e atenção.

As amigas, Tatiana, Martha, Maila, Rose e Midian, por toda a amizade, vocês estarão sempre em minha memória.

A todos meus familiares, meus avôs Antonio Rampazzo e Izabel Rampazzo, meus tios Carlos e Néia Rampazzo, Josefa e Segundo, Sérgio e Carmem, minha avó paterna Wanda de Assis Teixeira, minha amiga e prima Renata Teixeira de Castro, aos meus primos Thiago, Carla e Camila, meu futuro sogro José Elídio Catussi e família, minha amiga Glaucia Klebis e demais amigos do meu local de origem pela preocupação, carinho, amizade e compreensão pela minha ausência.

Ao meu avô Osvaldo Guimarães Teixeira (em memória) que não estava aqui para compartilhar estes momentos, mas os momentos que passamos juntos foram decisivos para que eu pudesse chegar até aqui, foi um exemplo de pai, amigo e companheiro, saudades...

A Alice Catussi, Rui Jorge, Murilo e Matheus os meus agradecimentos por toda a ajuda, hospedagem, amizade, acolhimento familiar que me proporcionaram em todos os momentos da execução deste projeto

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pela execução e compreensão dos cálculos estatísticos Á FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
<i>ABSTRACT</i>	2
I-INTRODUÇÃO.....	3
1. Consumo de álcool	3
2. Metabolização do álcool	3
3. Efeitos do álcool sobre sistema genital masculino	4
4. Histórico e Conceitos do Estresse	4
5. Estresse, Síndrome Geral de Adaptação e Alostasia	5
6. Eixo hipotálamo-hipófise-testículo-adrenal	7
7. Estresse	8
8. Estresse e Hormônios	11
9. Epidídimo.....	12
10. Etanol e Epidídimo	13
11. Modelos experimentais	14
12. Justificativa e objetivos.....	15
II-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
III- ARTIGO	26
V - CONCLUSÕES	58

RESUMO

Experiências traumáticas na infância estão associadas ao aumento do risco de abuso de álcool e de outras drogas na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse. A exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e, concomitantemente, reduz a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Assim, sabe-se que estresses sociais e ambientais produzem efeitos deletérios na função reprodutiva. No entanto, a maior parte dos trabalhos relacionando os efeitos deletérios do estresse sobre as funções reprodutoras masculinas está direcionada para a investigação de hormônios, raros são os relatos sobre os efeitos do estresse sobre o epidídimo. Pouco é conhecido sobre a complexa relação entre o estresse, o alcoolismo e as alterações dos genitais masculinos. Considerando as linhagens de ratos UCh, o conhecimento da alteração do eixo hipotálamo-hipófise-testículo e o estresse durante a seleção das linhagens UCh, despertou-se interesse na investigação do estresse neonatal sobre epidídimo dessas variedades, já que as alterações morfofisiológicas sobre os sistemas genitais masculino e feminino foram confirmadas. Além do que, muitos dos fatores observados no alcoólico podem ser frutos do estresse vivido precocemente, os quais podem estar potencializados ou não no homem adulto. Dessa forma, o presente trabalho propõe investigar e avaliar se a separação materna, aplicada em filhotes machos de ratos UChA UChB, interfere com parâmetros reprodutivos no adulto. Métodos propostos: avaliação hormonal das concentrações plasmáticas de testosterona, LH, FSH, estradiol e corticosterona, tempo de trânsito dos espermatozóides e análise da estrutura e morfométrica do epidídimo.

Palavras-chaves: Álcool, Estresse, Separação Materna, Epidídimo, UCh

ABSTRACT

Traumatic experiences in childhood are associated with an increase of the risk of alcohol and other drugs abuse in adolescence and adult life. Maltreated children and teenagers manifest biological disturb related to the response to stress. Chronic exposure to stressful factors increases the activity of the hypothalamic-hypophyseal-adrenal axis and also reduces the activity of the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis. Thus, it is known that social and environmental stressing factors produce impairing effects on reproductive functions. However, most part of the studies related to the damaging effects of stress on male reproductive functions are directed to hormone investigation, as reports of the effects of stress on the epididymis are quite rare. Little is known about the complex association among stress, alcoholism and male genital alterations. Considering the UCh rat lineage, the knowledge on its hypothalamic-hypophyseal-testicular axis alterations and the stress during UCh lineage selections, there was an interest in investigating the effects of neonatal stress on the epididymis of this lineage, since morphophysiological alterations in both male and female genital tracts have already been reported. Furthermore, many of the factors seen in alcoholism may be a result of early stress, which can be potentialized or not in the adult man. Therefore, the present work proposes to investigate and evaluate whether maternal separation interferes on UChA and UChB male rats reproductive parameters in the adult life or not. Proposed methods: plasmatic testosterone, LH, FSH, oestradiol and corticosterone levels evaluation, sperm transit time and analysis of the structure and morphometry of the epididymis.

Keywords: Alcohol, Stress, Maternal Separation, Epididymis, UCh

I- INTRODUÇÃO

1. Consumo de álcool

O uso de bebidas alcoólicas é tão antigo quanto a própria humanidade. Beber moderada e esporadicamente faz parte dos hábitos de diversas sociedades. Determinar o limite entre o beber social, o uso abusivo ou nocivo de álcool e o alcoolismo (Síndrome de Dependência do Álcool) é difícil, pois são tênues as diferenças, variam de pessoa para pessoa e de cultura para cultura. Estima-se que cerca de 10% das mulheres e 20% dos homens façam uso abusivo do álcool; 5% das mulheres e 10% dos homens apresentam a Síndrome de Dependência do Álcool ou alcoolismo. Sabe-se também que o álcool está relacionado com 50% dos casos de morte em acidentes automobilísticos, 50% dos homicídios e 25% dos suicídios. Frequentemente pessoas portadoras de outras doenças mentais (ansiedade, pânico, fobias, depressão) apresentam também problemas relacionados ao uso de álcool (NETO, 2003). O consumo de bebidas alcoólicas, quando excessivo, pode provocar disfunções como violência, suicídio, causar dependência química e outros problemas de saúde como cirrose, pancreatite, demência, polineuropatia, miocardite, desnutrição, hipertensão arterial, infarto e certos tipos de cânceres. O número de mortes e de incapacitados pelo consumo de álcool em todo o mundo equivale à soma dos casos provocados pela pressão alta e pelo fumo.

Halsted (2004) considerou o álcool como sendo uma droga muito usada na nossa sociedade e um alimento (7,1 kcal/g) presente, em aproximadamente 5 %, numa dieta americana. Assim, o alcoolismo, pelas complicações sobrevindas no plano somático e psíquico, e pela profunda repercussão no meio social, figura como um dos mais graves problemas de saúde pública no Brasil (FORTES & CARDÓ, 1991). Pesquisas demonstram que o consumo excessivo de álcool compromete, principalmente, o sistema nervoso central (CLAIR, 1991; SHRAM *et al.*, 2004; EDENBERG *et al.*, 2005; TRAN *et al.*, 2005), podendo afetar também o sistema genital (PALMER, 1989; MARTINEZ *et al.*, 1993; NOVELLI, *et al.*, 1997; MARTINEZ *et al.*, 1997, 2000; CAGNON *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2002).

2. Metabolização do álcool

O consumo crônico de álcool tanto no homem quanto no rato está associado ao aumento do retículo endoplasmático liso no fígado, possível local de oxidação do etanol (GAYOTTO & ALVES, 2001). O álcool depois de absorvido pelo trato gastro-intestinal é transportado através da circulação portal ao fígado onde é oxidado. Apenas 2% a 10% da

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

Independente da via metabólica, o etanol é convertido em aldeído acético e depois em acetato. O acetato é lançado na corrente sangüínea, sendo rapidamente metabolizado nos tecidos extra-hepáticos em dióxido de carbono e água. A enzima aldeído desidrogenase (ALDH) é responsável pela oxidação de aproximadamente 90% do aldeído acético formado pelo metabolismo do etanol.

Na oxidação do etanol mediada pela ADH e a do aldeído acético mediada pela ALDH, há transferência de íons de hidrogênio do etanol para o co-fator nicotiamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), sendo convertido para sua forma reduzida $\text{NADH}+\text{H}^+$. Nesses processos, há excesso de $\text{NADH}+\text{H}^+$ na matriz citoplasmática do hepatócito, alterando-se a homeostase celular. A manifestação mais freqüentemente relatada no uso excessivo do álcool é o fígado gorduroso. A lipogênese aumentada pode ser considerada como uma forma das células desfazerem-se do excesso de íons hidrogênio. A atividade do ciclo do ácido cítrico fica deprimida, pois as mitocôndrias utilizam os equivalentes de hidrogênio, originados no metabolismo do etanol, como fonte de energia, em detrimento dos derivados do metabolismo dos ácidos graxos. A diminuição da oxidação dos ácidos graxos resulta no acúmulo hepático de lipídio (LIEBER & De CARLI, 1991).

3. Efeitos do álcool sobre sistema genital masculino

Sabe-se que o etanol influencia a função reprodutiva em ratos adultos e que os efeitos deletérios manifestam-se por atrofia testicular, danos celulares no epitélio germinativo, redução da massa prostática e da vesícula seminal, do peso do epidídimo e diminuição da motilidade espermática (ANDERSON *et al.*, 1983). Além disso, o alcoolismo crônico tem sido associado com a impotência, diminuição da libido, ejaculação prematura, esterilidade e ginecomastia (BOYDEN & PAMENTER, 1983).

4. Histórico e Conceitos do Estresse

No século 19, Claude Bernard (1878) foi pioneiro em descrever a necessidade dos organismos em manterem o equilíbrio entre o meio interno e o externo. Sugeriu que o *milieu*

intérieure dependeria de um grupo de mecanismos compensatórios. Cinquenta anos mais tarde, Walter Cannon (1929) introduziu o conceito de *homeostasis* para descrever a dinâmica e a interatividade natural dos mecanismos na estabilidade do ambiente interno (CANNON, 1929; 1939). Cannon relatou o sistema nervoso autônomo (SNA) como orquestrador de respostas quando o organismo é repentinamente alterado. Segundo Cannon, o SNA e a glândula supra-adrenal funcionariam como unidade em resposta rápida do organismo frente à ameaça à homeostasia. Cannon voltou à atenção para o sistema nervoso simpático (SNS) como sistema homeostático essencial que serve para restaurar a homeostase por algum efector e promover a sobrevivência do organismo. Na reação de luta ou fuga, onde animais são expostos a situações ou fatores ameaçadores de sua homeostase, Cannon considerou a ativação de fatores endócrinos, envolvendo o eixo do sistema-simpático-medular-adrenal (SSMA) (CANNON & DE LA PAZ, 1911; CANNON, 1914; CANNON & LISSAK, 1914). Ainda de acordo com Cannon, a rápida ativação do sistema homeostático, especialmente do SSMA em situações de emergência, poderia preservar o ambiente interno através de ajustes compensatórios e antecipatórios, aumentando a probabilidade de sobrevivência (GAUTHIER *et al.* 1972;). Em 1939, Cannon propôs que a adrenalina não seria somente o princípio ativo da glândula supra-adrenal, mas também o neurotransmissor do SNS (CANNON & LISSAK, 1914). Entretanto, em 1946, aproximadamente um ano após a morte de Cannon, Von Euler identificou corretamente a noradrenalina como o neurotransmissor do SNS (VON EULER, 1946; GOLDSTEIN, 2003).

5. Estresse, Síndrome Geral de Adaptação e Alostasia

A palavra estresse foi primeiramente usada por Hans Selye que, em 1936, publicou sua teoria, onde propôs que estresse é a resposta não específica do organismo frente a agentes ameaçadores de sua integridade. Nessa síndrome do estresse, ocorreria a tríade patológica, representada pela hipertrofia da supra-adrenal, a ulceração gastro-intestinal e a involução do timo. Selye introduziu e popularizou o termo “estresse” na literatura científica e médica, embora, tivesse declarado, posteriormente, a interpretação errônea que fez do termo físico *stress*, que significa pressão. Revelou que, se fosse possível, mudaria o nome do fenômeno para *reação de esforço*. Entretanto, devido à popularização do termo *stress*, decidiu por não re-conceituá-lo. Assim, introduziu o termo estressor para designar o agente causador do estresse, sendo qualquer estímulo reconhecido como aversivo ou perigoso para a integridade do organismo, desencadeando a resposta de estresse (SELYE, 1946; 1956).

Selye voltou-se para o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) como efector chave da resposta ao estressor. Enfatizou o córtex da glândula adrenal como órgão responsável pela integração fisiológica e desenvolvimento de patologias em praticamente todos os tecidos do corpo (SELYE, 1946; 1956).

Mason (1975) relatou que nas respostas a diferentes estressores a atividade do eixo HHA poderia variar, sugerindo que a presença da tríade patológica pode não indicar a ocorrência de estresse (MASON, 1971; 1975; MUNCK *et al.*, 1984; GOLDSTEIN, 1995). Também propôs que emoções como ansiedade e medo constituem a base para respostas neuroendócrinas a diferentes estressores. Posteriormente, Weiner (1991) defendeu a especificidade da resposta ao estressor ao descrever estressores do meio físico e social que ameaçam o organismo e induzem padrões variados de resposta compensatória. Chrousos & Gold (1992) redefiniram estresse como o estado de desarmonia ou ameaça à homeostasia, promovendo adaptação fisiológica e comportamental, podendo ser específica para determinado estressor ou generalizada e inespecífica. Somente quando a ameaça à homeostasia excede o limiar, ocorre a síndrome não específica do estresse.

Selye também introduziu o termo “Síndrome Geral de Adaptação” (SGA), que se desenvolve em três estágios sucessivos: *reação de alarme*, *fase de resistência* e *de exaustão*. O primeiro estágio representa a resposta inicial do organismo frente a qualquer ameaça. Mediante essa situação, mecanismos orgânicos de defesa são acionados, como ativação do SNS e da medula da glândula supra-adrenal e o eixo HHA. Essa fase se caracteriza por aumento das capacidades orgânicas em responder ao estressor, com resposta fisiológica dos órgãos e sistemas à elevação da concentração plasmática das catecolaminas e dos glicocorticóides. Em seguida, mantido o estímulo, ocorreria a fase de resistência, caracterizada pela ativação de mecanismos adaptativos. Caso a adaptação não seja possível, instala-se a fase de exaustão, caracterizada pela depleção das reservas energéticas e o desenvolvimento de patologias, podendo sobrevir até a morte (SELYE, 1936; 1946; MEERSON, 1984; GRIFFIN, 1989; VAN DER KAR *et al.*, 1991; FRANKS, 1994).

Goldstein (2003) propôs que alterações no SNS não estão relacionadas apenas com situações emergenciais. Os níveis fisiológicos de atividade desse sistema podem variar para manter a homeostasia em situações rotineiras, dependendo da situação ou posição em que o organismo se encontra. Atividades diárias como estado alimentar (PATEL *et al.*, 2002), falar em público (GERRA *et al.*, 2001), mudança de postura e movimentos (LAKE *et al.*, 1976) também estão associados com alterações no SNS. Com essas alterações, mantém-se fluxo sanguíneo adequado para o cérebro manter a temperatura corporal e a distribuição de

combustíveis metabólicos para os órgãos, resultando no restabelecimento da homeostasia. De acordo com essa nova hipótese, cada atividade estaria relacionada com um diferente *estado normal*, controlado pelo sistema nervoso central (SNC) e mantido por ações coordenadas de vários sistemas efetores. Esse princípio levou ao conceito de *alostasia*, a estabilidade do meio interno é alcançada através da mudança (STERLING & EYER, 1988).

A regulação ao redor de um estado aparente alterado é a essência da alostasia (GOLDSTEIN, 2003). A alostasia depende da ativação de processos de adaptação por mediadores químicos como catecolaminas, esteróides da glândula supra-adrenal e citocinas. Quando ocorre superexposição a situações crônicas estressantes, as respostas fisiológicas são iniciadas, resultando em resposta alostática. Ao conjunto de alterações necessárias para manter a alostasia dá-se o nome de carga alostática (McEWEN, 1998). Se a resposta alostática é suficiente, ocorre adaptação e o organismo é protegido de danos. Porém, se a resposta alostática é prolongada, inadequada ou se o estressor aumenta ou se multiplica, ou ainda se há falha de adaptação, o resultado é a sobrecarga alostática, ou seja, má adaptação e danos a vários órgãos (McEWEN & STELLAR, 1993).

6. Eixo hipotálamo-hipófise-testículo-adrenal

Segundo Klassen & Persud (1978), a ingestão crônica de etanol diminui significativamente os níveis plasmáticos de testosterona, pois o álcool atua na conversão de testosterona a estrógeno através do processo de aromatização. A queda dos níveis plasmáticos de testosterona pode resultar em impotência, infertilidade e redução dos caracteres sexuais secundários, ocorrendo em 75% dos homens com cirrose avançada. O declínio da testosterona também é associado ao decréscimo na taxa de produção pelos testículos e ao aumento da quebra e remoção de testosterona da corrente sanguínea. (EMANUELE & EMANUELE, 1998; LLOYD & WILLIAMS, 1948). O baixo peso testicular (atrofia testicular) relativo ao peso do corpo é uma indicação clara da influência tóxica direta do álcool sobre os testículos, sobretudo nas células de Sertoli e Leydig, na alteração da produção, secreção e atividade dos níveis dos hormônios hipofisários LH e o FSH, revelando a influência dos efeitos dos produtos do metabolismo do álcool no eixo hipotálamo-hipófise-testículo-adrenal (ADLER, 1992; EMANUELE & EMANUELE, 1998; TADIC *et al.*, 2000; KLASSEN & PERSAUD, 1978; MARTINEZ, 2000).

Alguns autores sugerem que o acetaldeído, um dos produtos do metabolismo do álcool, possa ser também um fator de contribuição para a supressão de testosterona, pois estudos revelaram que o acetaldéido foi mais potente que o álcool nesse efeito (BADR *et al.*,

1977; COBB *et al.*, 1978). Acredita-se que a enzima que medeia a quebra de álcool a acetaldeído use certas moléculas, isto é, co-fatores também requeridos por outras enzimas envolvidas na produção de testosterona (ELLINGBOE & VARANELLI, 1979; GORDON *et al.*, 1980).

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

7. Estresse

O estresse é um agente principal na patogênese de muitas psicopatologias e doenças em geral. Embora, a resposta orgânica aos efeitos do estresse desencadeie diferentes suscetibilidades, seu mecanismo de ação através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é bem estudado. Os glicocorticóides, liberados pela ativação do eixo HHA após uma situação estressante, constituem fator deletério para o organismo e, em especial, para a função reprodutiva (NEWPORT *et al.*, 2002).

A literatura especializada provê fortes evidências de que eventos estressantes, durante o desenvolvimento precoce, contribuem significativamente para tornar o adulto vulnerável a psicopatologias. Os cuidados paternos contribuem para produzir respostas adaptativas a fatores estressantes, protegendo a criança de posterior vulnerabilidade a doenças. Porém, a privação da presença dos pais, especialmente materna, pode romper com essa proteção, bem como ser, por si só, um fator estressante durante o início da vida (DE BELLIS *et al.*, 1999; NEWPORT *et al.*, 2002).

São de fundamental importância estudos experimentais que consideram os efeitos de impactos crônicos, ocorridos no ambiente pós-natal, sobre o neurocomportamento. Constituem exemplos de uma abordagem interdisciplinar, considerando as interfaces entre as ciências biológicas, sociais e médicas (PRYCE & FELDON, 2003).

Modelos animais, embora com limitações, são ferramentas importantes para a pesquisa psiquiátrica por oferecer certas vantagens em relação às pesquisas com seres humanos. Experimentos com roedores, que possuem período gestacional breve, facilitam o acompanhamento do desenvolvimento, permitem manipulações específicas do ambiente e medidas invasivas das atividades biológicas (NEWPORT *et al.*, 2002). Estudos em animais indicam que perturbações, durante período de cuidados maternos com a ninhada, produzem

impactos deletérios e persistentes no comportamento da prole. Fatores estressantes, incluindo separação materna, produzem no animal comportamento característico de ansiedade e de desordem afetiva. Tal paradigma de estresse induz, uniformemente, hiper-responsividade persistente no eixo HHA, a qual é secundária a hipersecreção do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH). Segundo NEWPORT *et al.* (2002), esses resultados são notavelmente similares aos observados nas doenças relacionadas ao estresse em seres humanos. Crianças que sofreram estresse durante a infância, devido a alterações no comportamento dos pais, demonstram alterações permanentes no comportamento (TEICHER, 2000).

Nos mamíferos, a mãe é a fonte nutricional do infante, no entanto, a relação complexa infante-mãe vai além do suprimento das necessidades nutricionais. A mãe provê estímulos essenciais térmicos, somatossensórios, olfatórios, visuais e auditivos durante grande parte do desenvolvimento pós-natal. O ambiente produz impactos, tanto em animais quanto no ser humano, que influenciarão, neurobiologicamente e psicologicamente, a vida inteira (DE BELLIS *et al.*, 1999; TEICHER, 2000; PRYCE & FELDON, 2003).

Os efeitos crônicos da manipulação neonatal foram pioneiramente estudados por Levine há mais de 50 anos, desenvolvendo modelos de estimulação neonatal para estudo dos efeitos do estresse. Os primeiros estudos comparavam filhotes manipulados com filhotes sem manipulação humana. Posteriormente, críticas foram feitas sobre a artificialidade de um grupo de animais de laboratório sem qualquer manipulação humana, bem como ao grupo estimulado manualmente, através da manipulação neonatal (EH - *early handling*), cuja manipulação tátil não representaria um fator estressante, mas estimulador dos cuidados maternos, melhorando a resposta do filhote ao estresse (PRYCE *et al.*, 2001; NEWPORT *et al.*, 2002; PRYCE & FELDON, 2003).

A manipulação neonatal (EH - *early handling*) diminui a atividade do eixo HHA. Estudos demonstraram respostas baixas do ACTH e de corticosterona após subseqüentes fatores estressantes. Manipulação neonatal também produz redução dos níveis circulantes basais do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona. Segundo Newport *et al.* (2002), a manipulação neonatal constitui uma súbita variação ambiental que pode afetar a ontogênese dos sistemas biológicos. No entanto, não pode ser diretamente aplicada para o estudo do impacto do estresse referente aos cuidados maternos, visto que, a manipulação melhora a adaptabilidade do rato a subseqüentes estresses. Uma possível explicação é que o filhote não considera a manipulação tátil um estímulo nocivo, nem desconfortável. Outra observação é o aumento dos cuidados maternos à prole, causando benefícios à adaptabilidade do filhote.

Outro modelo utilizado denomina-se privação materna (*maternal deprivation* - MD ou *early deprivation* - ED). Nesse modelo, os filhotes são separados da mãe em intervalos superiores a uma hora, durante dias do desenvolvimento pós-natal, antes do desmame. Assim, os filhotes não só ficam privados dos cuidados maternos durante o período, que pode ser de até 24 horas, mas também sofrem pela alteração do comportamento materno aberrante, que persiste após a reunião mãe-filhotes. A privação materna induz alteração na atividade do eixo HHA, aumentando as concentrações séricas de ACTH e de corticosterona. São observadas diferentes alterações neurobiológicas conforme diferentes modelos de separação materna, contudo quando a privação ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, tornam-se duradouras (PRYCE *et al.*, 2001; NEWPORT *et al.*, 2002; PRYCE & FELDON, 2003; SCHMIDT *et al.*, 2004).

O conhecimento atual das complexas inter-relações dos processos orgânicos relacionados ao estresse, do controle dos sistemas nervoso e endócrino e das funções reprodutivas é rudimentar. No entanto, sabe-se que o estresse pode suprimir a atividade do eixo reprodutivo, que os hormônios reprodutivos podem modular a atividade nervosa controladora das respostas orgânicas ao estresse e que indivíduos com depressão podem ter, tanto as funções reprodutivas quanto a resposta ao estresse, alteradas (CAMERON, 2004).

Exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo HHA e, concomitantemente, reduz a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) (YOUNG & KoRSZUN, 2002; RETANA-MARQUEZ *et al.* 2003). Não há dúvidas, portanto, que estresses sociais e ambientais produzem efeitos deletérios na função reprodutiva (WINGFIELD & SAPOLSKY, 2003). No entanto, diferentes fatores estressantes produzem diferentes efeitos reprodutivos, havendo respostas distintas a curto e longo prazo. Estresse de curta duração, muitas vezes, não acarreta alterações reprodutivas e há fatores considerados “estressantes” que são estimulantes. Também, observa-se especificidade dos efeitos do estresse na reprodução, considerando diferentes espécies, bem como ao considerar diferenças sexuais nos níveis de funcionamento no eixo HHG (TILBROOK *et al.*, 2000; MOTZER & HERTIG, 2004).

O eixo HHA está normalmente quiescente durante o período hiporresponsivo ao estresse (SHRP), do 4^o ao 14^o dia pós-natal nos ratos. Nesse período, o rato neonato demonstra, aparentemente, pouca ou nenhuma resposta adrenocortical a estímulos estressores, que no adulto resultaria em aumento significativo das concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona (SMITH *et al.*, 1997; YOSHIMURA *et al.*, 2003; SCHMIDT *et al.*, 2003). No entanto, a privação materna pode desinibir o eixo HHA, possibilitando ao rato neonato

responder a fatores estressantes brandos. Essa experiência ambiental precoce (privação materna) pode conduzir a alterações permanentes da resposta ao estresse e ser um fator significativo de risco de psicopatologias na vida adulta (SMITH *et al.*, 1997; LEVINE, 2001; LEHMANN *et al.*, 2002; SCHMIDT *et al.*, 2004).

Mazaro (2003) demonstrou a importância do ambiente neonatal para o desenvolvimento posterior do sistema genital. Utilizando estimulação neonatal em ratos machos, observou efeitos deletérios prolongados em parâmetros reprodutivos na puberdade, como diminuição na quantidade de gametas no testículo e epidídimo. Também observou diminuição na concentração plasmática de LH, porém não nas concentrações de FSH e de testosterona.

Experiências traumáticas na infância precoce estão associadas ao aumento do risco de abuso de álcool e substâncias na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse, incluindo influências deletérias no desenvolvimento cerebral. Esses distúrbios podem ser a causa do aumento do risco de abuso de álcool durante a adolescência e na vida adulta (DE BELLIS, 2002; ROMAN *et al.*, 2004).

Utilizando modelo experimental de separação materna em ratos, Roman *et al.* (2004) verificaram que tal componente estressante não alterou o consumo voluntário de etanol em fêmeas. Contudo, dados na literatura especializada são controversos a respeito de alterações do consumo voluntário de etanol em ratos machos, submetidos à separação materna durante o desenvolvimento pós-natal. Sugere-se haver diferenças sexuais nas conseqüências comportamentais da separação materna, quando considerado o consumo voluntário de etanol (PLOJ *et al.*, 2003 ROMAN *et al.*, 2004).

8. Estresse e Hormônios

Segundo Rivier & Riviest (1991) uma das conseqüências do estresse é a interrupção das funções reprodutivas nos mamíferos. O estresse é acompanhado pelo aumento da atividade do eixo HHA e pelo decréscimo na atividade do eixo HHG (SELYE, 1939). È sugerido uma possível regulação hormonal entre os eixos HHA e o HHG.

Os hormônios relacionados ao estresse, como por exemplo, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e os corticoesteróides adrenais podem influenciar a função reprodutiva em todos os três níveis do eixo HHG (RIVIER & RIVIEST, 1991). VREEBURG & DEGREEF (1984) relataram que altas concentrações de CORT no soro de ratos aumentam a sensibilidade dos efeitos da retroalimentação negativa da testosterona e inibem as funções

testiculares. Neste experimento o álcool e a hiper-reatividade do eixo HHA a MS atuaram no aumento dos níveis de CORT em relação aos níveis observados nos animais controles, concordando com os dados atuais da literatura científica especializada.

Cícero (1981) ao avaliar os efeitos neuroendocrinológicos do álcool documentou que o mesmo suprime a atividade do eixo HHG. Considera-se que o álcool exerce efeito no hipotálamo deprimindo a liberação do hormônio liberador de LH (LHRH), resultando na diminuição dos níveis plasmáticos de LH e de testosterona nos testículos inibindo diretamente a biossíntese de testosterona (ADAMS & CÍCERO, 1991).

9. Epidídimo

O epidídimo constitui parte da via espermática e representa um importante sítio de maturação e armazenamento de espermatozóides. As funções do epitélio epididimário incluem a absorção, a secreção, a síntese e o metabolismo de algumas glicoproteínas, criando assim um ambiente luminal apropriado para aquisição da habilidade de fertilização e motilidade dos espermatozóides (SERRE & ROBAIRE, 1998).

Segundo Robaire & Hermo (1988), o modelo histológico regional do epidídimo compreende: o segmento inicial e a cabeça ambos relacionados à absorção da fase fluida do líquido seminífero; o corpo relacionado à habilitação da fertilização (maturação) dos espermatozóides; e a cauda com suas partes proximal e distal destinadas à estocagem dos espermatozóides no ducto epididimário.

O epidídimo possui epitélio pseudoestratificado com seis tipos celulares distintos: células principais, basais, claras, halo, delgadas e apicais (Hamilton, 1975; Robaire & Hermo, 1988; Serre & Robaire, 1998). O tipo celular mais abundante é a célula principal estando envolvida em processos de absorção, secreção (NICANDER & MALMQVIST, 1977), endocitose e transcitose (ROBAIRE & HERMO, 1988).

De acordo com Robaire & Hermo (1988), o epidídimo dos mamíferos não tem sido estudado como um dos órgãos alvos para avaliação dos efeitos tóxicos de diferentes drogas. Na literatura científica especializada, observa-se poucos trabalhos relacionando os efeitos tóxicos do etanol sobre a morfofisiologia do epidídimo.

Os espermatozóides testiculares não têm a habilidade para fertilização. A maturação espermática, ou seja, a capacidade de fertilização, ocorre através do trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo (HERMO & ROBAIRE, 2002). A integridade estrutural e funcional do epidídimo depende da testosterona e de outros fatores reguladores secretados pelo testículo (ROBAIRE & VIGER, 1995; EZNER & ROBAIRE, 2002). Morfologicamente,

o epidídimo pode ser dividido em quatro regiões anatômicas distintas: o segmento inicial (IS), a cabeça (CT), o corpo (CP) e a cauda (CD), e ao longo dessas diferentes regiões o epitélio epididimário está constituído por cinco tipos de células: principal, clara, basal, halo e *narrow* (Robaire e Hermo, 1998). A interação celular no epidídimo é necessária para a formação de uma barreira hemato-epididimária especializada entre as células epiteliais principais. Essa barreira cria microambiente único na luz do epidídimo essencial a maturação espermática (CYR *et al.*, 1995, 2003). Variações na população de células epiteliais, nos diâmetros tubular e luminal e na altura do epitélio são freqüentemente observadas nas diferentes regiões do epidídimo. À medida que se observa o aumento progressivo dos diâmetros do túbulo e da luz da região proximal em direção a região distal, nota-se que a altura do epitélio possui comportamento inverso (ROBAIRE & HERMO, 1998).

10. Etanol e Epidídimo

O etanol pode suprimir as funções reprodutivas em humanos, primatas e em pequenos roedores (KIM *et al.*, 2003). O etanol promove a infertilidade masculina causando dano direto no armazenamento dos espermatozóides no epidídimo e na velocidade de progressão dos espermatozóides no sistema genital feminino (ANDERSON *et al.*, 1983). O distúrbio da fertilidade relacionado à ingestão do etanol promove baixa concentração espermática com prejuízo na motilidade dos espermatozóides morfológicamente normais e aumento do número de teratozoospermia (KUCHERIA *et al.*, 1985; GOMATHI *et al.*, 1993; VILLALTA *et al.*, 1997). Segundo Srikant *et al.* (1999) essas modificações são reflexos de alterações no meio epididimário levando ao comprometimento da maturação dos espermatozóides. Além disso, verifica-se que o etanol modifica o nível de amins biogênicas, especialmente no corpo e cauda do epidídimo (RONDINA *et al.*, 1989).

Pereira *et al.* (2003) observaram no epidídimo de ratos submetidos à ingestão crônica de álcool desorganização estrutural epitelial, destacando-se dilatações das cisternas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi das células principais, aumento de gotas lipídicas nas células principais e claras, indicando alteração do metabolismo lipídico intermediário frente à ingestão de etanol. Os efeitos da administração prolongada de etanol em ratos UCh produzem significativas alterações morfofisiológicas no sistema genital masculino e no eixo HHG (MARTINEZ *et al.*, 2000, 2002; RISSATO *et al.*, 2003; CÂNDIDO *et al.*, 2006). Martinez *et al.* (2000) ao avaliarem a morfologia do epidídimo de ratos das linhagens UChA, UChB (bebedores voluntários de etanol) em relação a Wistar (controle) observaram atrofia no epitélio da cauda do epidídimo devido a diminuição da área citoplasmática.

11. Modelos experimentais

Desde a década de 40, pesquisadores têm investigado roedores com preferências ao consumo de álcool. Esses estudos relatam que ratos e camundongos bebem mais álcool do que água em concentrações baixas de álcool (até 6% v/v), pelo fato da solução de álcool apresentar sabor doce. Em concentrações elevadas de álcool, entretanto, em que o sabor da solução, geralmente, é aversivo aos roedores, observou-se diferenças entre indivíduos e entre as linhagens na preferência pela ingestão de álcool. Essas observações sugerem que os animais preferem primeiramente o álcool pelo sabor que pelo seu efeito estimulador sobre o sistema nervoso central. A variabilidade na preferência ao álcool entre os indivíduos e entre as linhagens permitiu a seleção de raças de ratos e camundongos para a predileção ao álcool, gerando pares de animais que são caracterizados por consumir níveis baixos ou altos de álcool (SPANAGEL, 2000).

Li *et al.* (1987) relataram a existência de pares de linhagens de ratos de consumo de álcool. Os ratos UChA e UChB (UCh = Universidade do Chile), os de Helsink, iniciados por Kalervo Eriksson e os de Lumeng & Li em Indianápolis. As linhagens AA (*Alko Alcohol*) e ANA (*Alko Nonalcohol*) de Helsink foram obtidas por cruzamentos alternados *inbreeding* com *outbreeding*. As linhagens P (*Alcohol Preferring - 5-8g/kg/day*) e NP (*Non-Alcohol-Preferring - menos de 0,5g/kg/dia*) de Lumeng & Li têm sido obtidas por cruzamentos *outbreeding*. Além dessas linhagens de ratos, existem raças de camundongos, entre as de consumo voluntário mais elevado é a C57BL/6 e entre as de consumo baixo é a BALB e DBA (MCCLEARN & RODGERS, 1961). As variedades de ratos UChA e UChB constituem modelos raros para estudos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool, tão bem quanto o apetite e a tolerância que são importantes fatores do alcoolismo humano.

No modelo UCh os animais têm demonstrado a presença de mecanismos de apetite e saciedade ao álcool com as respectivas redes neuronais envolvidas. Para que ocorra a manifestação da doença alcoolismo é necessário, além da predisposição genética, que o paciente tenha bebido álcool em grandes quantidades durante um longo período, o que faz da linhagem UCh um adequado modelo experimental. Esses animais possuem uma predisposição genética para ingerir voluntariamente pequenas quantidades de etanol a 10%, como o observado em pessoas com o alelo da enzima ADH*2 ($\beta_2\beta_2$) que geralmente não consomem bebidas alcoólicas pela alta frequência de reações adversas. Há, pelo menos, dois caminhos importantes para o enfoque dos estudos sobre o alcoolismo humano: 1) a busca de marcadores

genéticos que indiquem a predisposição ao alcoolismo e 2) a busca de terapêuticas eficazes para o tratamento do alcoolismo (Mardones, 1993).

12. Justificativa e objetivos

Experiências estressantes vividas precocemente refletem em fatores que podem potencializar ou não o uso abusivo de álcool na vida adulta. Baseado nessas observações o objetivo desse trabalho foi avaliar se a separação materna potencializa os efeitos deletérios da ingestão de etanol sob aspectos morfofuncionais do epidídimo e sob os níveis plasmáticos dos hormônios gonadotróficos, gonadais e da corticosterona em ratos UCh.

II-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. L.; Cicero, T. J. Effects of alcohol on, β -endorphin and reproductive hormones in the male Rat. *Alcohol Clin Exp Res.*, v.15, p.685-692, 1991.

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

ANDERSON Jr, R.A.; WILLIS, B.R, OSWALD, C.; ZANEVELD, L.J. Male reproductive tract sensitivity to ethanol: a critical overview. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.18, Suppl 1, p.305-310, 1983.

BADR, F.R.; BARTKE, A.; DALTERIO, S.; BULGER, W. Suppression of testosterone production by ethyl alcohol: Possible mode of action. *Steroids*, v.30, p.647-655, 1977.

BOYDEN, T.W.; PAMENTER, R.W. Effects of ethanol on male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocr. Rev.*, v.4, p.389-395, 1983.

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

CAMERON, J. L. Interrelationships between hormones, behavior, and affect during adolescence: complex relationships exist between reproductive hormones, stress-related hormones, and the activity of neural systems that regulate behavioral affect. Comments on part III. *Ann. New Y. Acad. Sci.*, v. 1021, p. 134-142, 2004.

CÂNDIDO, E. M.; CARVALHO, C. A. F.; MARTINEZ, F. E.; CAGNON, V. H. A. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biol. Int.*, p.1-14, 2006.

CANNON, W.B. Organization for physiology homeostase. *Physiol. Rev.*, v. 9, p. 399-431, 1929.

CANNON, W.B. The emergency function of the adrenal medulla in pain and in the major emotions. *Am. J. Physiol.*, v. 33, p. 356-372, 1914.

- CANNON, W.B.; DE LA PAZ, D. Emotional situation of adrenal gland secretion. *Am. J. Physiol.*, v. 28, p. 64-70, 1911.
- CANNON, W.B.; LISSAK, K. Evidence for adrenaline in adrenergic neurones. *Am. J. Physiol.*, v. 125, p. 765-777, 1914.
- CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, v.267, p.1244-1252, 1992.
- CICERO, T.J. Neuroendocrinological effects of alcohol. *Annu. Rev. Med.*, v.32, p.123-142, 1981.
- CLAIR, H.R. St. Recognizing alcoholism and its effects: a mine-guide. Basel: S. Karger, p. 105, 1991
- COBB, C.F.; ENNIS, M.F.; VAN THIEL, D.H.; GAVALER, J.S.; LESTER, R. Acetaldehyde and ethanol are direct testicular toxins. *Surg. Forum*, v.29, p.87-102, 1978.
- CYR, D.G.; DUFRESNE, J.; GREGORY, M. Intercellular communication and tubule integrity. In Hinton, B.T.; Turner, T.T. (Eds.). *The Third International Conference on the Epididymis*. Charlottesville: The Van Doren Co. 2003, p.50-59.
- CYR, D.G.; ROBAIRE, B.; HERMO, L. Structure and turnover of the junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc. Res. Tech.*, v.30, p.54-66, 1995.
- DE BELLIS, M.D. Developmental traumatology: a contributory mechanism for alcohol and substance use disorders. *Psychoneuroendocrinology*, v.27, p.155-170, 2002.
- DE BELLIS, M.D.; KESHAVAN, M.S.; CLARK, D.B.; CASEY, B.J.; GIEDD, J.N.; BORING, A.M.; FRUSTACI, K.; RYAN, N.D.A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part II: brain development. *Biol. Psychiatr.*, v.45, p.1235-1236, 1999.
- EDENBERG, H.J.; STROTHER, W.N.; MCCLINTICK, J.N.; TIAN, H.; STEPHENS, M.; JEROME, R.E.; LUMENG, L.; LI, T.K.; MCBRIDE, W.J. Gene expression in the hippocampus of inbred alcohol-preferring and nonpreferring rats. *Genes Brain & Behav.*, v.4, n.1, p.20-30, 2005.

ELLINGBOE, M.A.; VARANELLI, C.C. Ethanol inhibits testosterone biosynthesis by direct action on Leydig cells. *Res. Commun. in Chem. Patho. Pharmacol.*, v.24, p.87-102, 1979.

EMANUELE, M.A.; EMANUELE, N. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health Res. World*, v.22, n.3, p.195-201, 1998.

EZNER, N.; ROBAIRE, B. Androgenic regulation of the structure and functions of the epididymis. In Robaire, B.; Hinton, B. (Eds.). *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Plenum Press, 2002, p.297-316.

FORTES, J.R.A.; CARDO, W.N. *Alcoolismo*. São Paulo: Sarvier, 1991.

FRANKS, B. D. What is stress? *Quest*, v. 46, p. 1-7, 1994.

GAUTHIER, P.; NADEAU, R.; DE CHAMPLAIN, J. Acute and chronic cardiovascular effects of 6-hydroxydopamine in dogs. *Circ. Res.*, v. 31, p. 207- 217, 1972.

GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu, 2001. v.2, p. 674-680.

GERRA, G.; ZAIMOVIC, A.; MASCETTI, G. G.; GARDINI, S.; ZAMBELLI, U.; TIMPANO, M.; RAGGI, M. A.; BRAMBILLA, F. Neuroendocrine response to experimentally-induced psychological stress in healthy humans. *Psychoneuroendocrinology*, v. 26, p. 91-107, 2001.

GOLDSTEIN, D. S. Catecholamines and stress. *Endocr. Reg.*, v. 37, p. 69-80, 2003.

GOLDSTEIN, D. S. *Stress, catecholamines, and cardiovascular disease*. New York: Oxford University Press, 1995. p.573.

GOMATHI, C.; BALASUBRAMANIAN, K.; VIJAYABANU, N.; SRIKANTH,V.; GOVINDALAJULU, P. Effects of chronic alcoholism on some studies on lipid profiles. *Int J. Androl.*, v.16, p. 175-181, 1993.

GORDON, G.S.; SOUTHREN, A.L.; VITTEK, J.; MUNNANGI, P.; LIEBER, C.S. Effect of chronic ethanol ingestion on the biosynthesis of steroids in rat testicular homogenate in vitro. *Endocrinology*, v.106, p.1880-1885, 1980.

- GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: an unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.20, p. 263-312, 1989.
- HALSTED, C. H. M. D. Nutrition and alcoholism liver disease. *Semin. Liver Dis.*, v.24, n.3, p.289-304, 2004.
- HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire, B.; Hinton, B. (Eds.). *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Plenum Press, 2002, p.81–102.
- KIM, J.H.; KIM, H. J.; NOH, H.S.; ROH, G. S.; KANG, S.S.; CHO, G.J.; PARK, S.K.; LEE, B.J.; CHOI, W.S. Suppression by ethanol of male reproductive activity. *Brain Res.* v.989, p.91–98, 2003.
- KLASSEN, R.W.; PERSAUD, T.V.N. Influence of alcohol on the reproductive system of the male rat. *Int. J. Fertil.*, v.23, n.3, 1978, p.176-184.
- KUCHERIA, K.; SAXENA, R.; MOHAN, D. Semen analysis in alcohol dependence syndrome. *Andrologia*, v.17, n.6, p.558-563, 1985.
- LAKE, C. R.; ZIEGLER, M. G.; KOPLIN, I. J. Use of plasma norepinephrine for evaluation of sympathetic neuronal function in man. *Life Sci.*, v. 18, p. 1315-1325, 1976.
- LEHMANN, J.; RUSSIG, H.; FELDON, J.; PRYCE, C.R. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacology, Biochem. Behav.*, v.73, p.141-145, 2002.
- LEVINE, S. Primary social relationship influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.*, v.73, p.255-260, 2001.
- LI, T.K.; LUMENG, L.; MCBRIDE, W.J.; MURPHY, J.M. Rodent lines selected for factors affecting alcohol solution. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, v.1, p. 91-96, 1987.
- LIEBER, C.S. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.*, v.13, p.136-153, 1993.
- LIEBER, C.S.; DE CARLI, L.M. Hepatotoxicity of ethanol. *J. Hepathol.*, v.12, p.394-401, 1991.

LLOYD, C.W.; WILLIAMS, R.H. Endocrine changes associated with Laennec's cirrhosis. *Ann. Am. J. Med.*, v.43, p.315-330, 1948.

MARDONES, J. Es la predisposición genética al alcoholismo una perturbación del mecanismo de la saciedad de alcohol? *El Pensamiento de los Premios Nacionales de Ciencia*, p.19-34, 1993.

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

MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J.; PADOVANI, C.R.; CAGNON, V.H.; MARTINEZ, M. Ultrarstructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *The Prostate*, v.22, p.317-324, 1993.

MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; BUSTOS-OBREGON, E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.32, p.175-184, 2000.

MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M.; QUITETE, V.H.A.C.; MELLO, JR.W.; PADOVANI, C.R. Alcoolismo, reprodução e genética. *Vet. Not.*, v.8, n.2, p.121-130, 2002.

MASON, J. W. A historical view of the stress field. *J. Hum. Stress*, v. 1, n. 2, p. 22-36, 1975.

MASON, J. W. A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J. Psychiatr. Res.*, v.8, p. 323-333, 1971.

MAZARO, R. *Efeitos da estimulação neonatal e do estresse peripuberal sobre parâmetros reprodutivos de ratos machos púberes*. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, de Ribeirão Preto, 2003.

McCLEARN, E.; RODGERS, D.A. Genetic factors in alcohol preference of laboratory mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, v.54, p.116-119, 1961.

McEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.*, v. 33, p.171-179, 1998.

- McEWEN, B.; STELLAR, E. Stress and the individual mechanism leading to disease. *Arch. Int. Med.*, v.153, p. 2093-2101, 1993.
- MEERSON, F. Z. Adaptation, stress and prophylaxis. *Metab. Clin. North Am.*, v.30, p.695–728, 1984
- MOTZER, S.A.; HERTIG, V. Stress, stress and health. *Nurs. Clin. North Am.*, v.39, p.1-17, 2004.
- MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.*, v.5, p.25-44, 1984.
- NETO, M.R.L. Saúde Mental. São Paulo. *Psiquiatr. Psicanál. on line*, 2003. Disponível em: <<http://www.mentalhealth.med.br>>. Acesso em: 10 dez. 2003.
- NEWPORT, J.D.; STOWED, Z.N.; NEMEROFF, C.B. Parental depression: animal models of an adverse live event. *Am. J. Psychiatry*, v.159, p.1265-83, 2002.
- NICANDER, L.; MALMQVIST, M. Ultrastructural observations suggesting merocrine secretion in the initial segment of the mammalian epididymis. *Cell Tissue Res.*, v.184, p.487-490, 1977.
- NOVELLI, E.L.B.; RODRIGUES, N.L.; SANTOS, C.X.; MARTINEZ F.E.; NOVELLI, J.L. Toxic effects of alcohol intake on prostate of rats. *The Prostate*, v.31, n.1, p.37-41, 1997.
- PALMER, T.N. The biochemistry of alcohol and alcohol abuse. *Sci. Prog.*, v.73, p.1-15, 1989.
- PATEL, J. N.; COPPACK, S. W.; GOLDSTEIN, D. S.; MILES, J. M.; EISENHOFER G. Norepinephrine spillover from human adipose tissue before and after a 72-hour fast. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 87, p. 3373-3377, 2002.
- PEREIRA, M. A. S.; ORSI, A. M.; MOLINARI, S. L.; GARCIA, P. J. Alcohol effects on the principal and clear cells of the Caput Epididymis of Albino Rats. *Anat. Histol. Embryol.*, v.32, p.17–20, 2003.

PLOJ, K.; ROMAN, E.; NYLANDER, I. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience*, v.121, p.787-799, 2003.

PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Inc. Dev. Psychobiol.*, v.38, p. 239-251, 2001.

PRYCE, C. R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 27, p. 57-71, 2003.

RETANA-MÁRQUEZ S.; BONILLA-JAIME H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTÍNEZ-GARCÍA R.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm. Behav.*, v. 44, n.4, p. 327-337, 2003.

RISSATO, J.H.; IETSUGU, M.V.; ALMEIDA, C.C.; PINHEIRO P.F.; SEGATELLI T.M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; JUNIOR, W.M.; QUITETE, V.H.; MARTINEZ, F.E. Morphology of the vas deferens in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.35, p. 331-341, 2003.

RIVER, C.; RIVIEST, S. Effect of stress on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.*, v.45, p.523-532, 1991.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: KNOBIL, E.; Neill, J.D. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988. p.999-1080.

ROBAIRE, B.; VIGER, R. S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.*, v.52, p.226-236, 1995.

ROMAN, E.; PLOJ, K.; NYLANDER, I. Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol*, v.33, p.31-39, 2004.

RONDINA, D. C.; MASTRONARDI, I. O.; CARBONE, S. E.; SZWARCFARB, B.; SCACCHI, P. Effects of acute administration or chronic ethanol ingestion on sexual organs monoamine levels in male rats. *Gen. Pharmacol.*, v.20, p.161-163, 1989.

SCHMIDT, M.; ENTHOVEN, L.; VAN DER MARK, M.; LEVINE, S.; DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S. The postnatal development of the hypothalamic-adrenal axis in the mouse. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v.21, p.125-132, 2003.

SCHMIDT, M.; ENTHOVEN, L.; VAN WOEZIK, J.H.; LEVINE, S.; DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J. Neuroendocrinol.*, v. 16, p. 52-57, 2004.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, v. 138, n. 1, p. 32, 1936.

SELYE, H. The general adaptive syndrome and disease of adaptation. *J. Clin. Endocrinol.*, v.6, p.117-230, 1946

SELYE, H. *The stress of life*. New York: McGraw-Hill Books Inc., 1956. 324 p.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biol. Reprod.*, v.58, p.497-513, 1998.

SHRAM, M.J.; BAHROOS, M.; BELESKEY, J.I.; TAMPAKERAS, M.; LE, A.D.; TOMKINS, D.M. Motor impairing effects of ethanol and diazepam in rats selectively bred for high and low ethanol consumption in a limited-access paradigm. *Alcohol.: Clin. Exp.Res.*, v.28, n.12, p.1814-1821, 2004.

SMITH, M.A.; KIM, S.; VAN OERS, H.J.J.; LEVINE, S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*, v.138, p.4622-4628, 1997.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res. Health*, v.24, n.2, p.124-131, 2000.

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

STERLING, P.; EYER, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: FISCHER, J.; REASON, J. (Eds.) *Handbook of life stress, cognition and health*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1988. p. 629-649.

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

TEICHER, M. H. Wounds that time won't heal: the neurobiology of child abuse. *Cerebrum*, v. 2, p. 50-67, 2000.

TILBROOK, A. J.; TURNER, A.I.; CLARKE, I.J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. Reprod.*, v.5, p.105-113, 2000.

TRAN, T.D.; JACKSON, H.D.; HORN, K.H.; GOODLETT, C.R. Vitamin E does not protect against neonatal ethanol-induced cerebellar damage or deficits in eyeblink classical conditioning in rats. *Alcoholism*, v.29, n.1, p.117-129, 2005.

VAN DE KAR, L. D.; RICHARDSON-MORTON, K. D.; RITTENHOUSE, P. A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. *Methods Arch. Exp. Pathol.*, v.14, p. 133-173, 1991.

VILLATA, J.; BALLESCA, J. L.; NICOLÁS, J. M.; MARTINEZ DE OSABA. M. J.; ANTUNES, E.; PIMENTEL, C. Testicular function in asymptomatic chronic alcoholism: relation to ethanol intake. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 21, p. 128-133, 1997.

VON EULER, U. S. A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol. Scand.*, v. 12, p. 73-96, 1946.

VREEBURG, J. T. M.; DEGREEF, W. J.; OOMS, M.P.; VANWOUW, P.; WEBER, R. F. A. Effects of adrenocorticotropin and corticosterone on the negative feedback action of testosterone in the adult male rat. *Endocrinology*, v.115, p.977-983, 1984.

WEINER, H. Behaviour biology of stress and psychosomatic medicine. In: BROW, M.R.; KOOB, G.F.; RIVIER, C. (Eds.). *Stress: neurobiology and neuroendocrinology*. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 23-51.

WINGFIELD, J.C.; SAPOLSKY, R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinol.*, v.15, p.711-724, 2003.

YOSHIMURA, S.; SAKAMOTO, S.; KUDO, H.; SASSA, S.; KUMAI, A.; OKAMOTO, R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*, v.68, p.439-445, 2003.

YOUNG, E. A.; KORSZUN, A. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in mood disorders. *Endocrinol. Metabol. Clin. North Am.*, v. 31, n.1, p. 63-78, 2002.

III- ARTIGO

Este trabalho deu origem ao artigo: **EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E DO ALCOOLISMO NO EPIDÍDIMO DE RATOS UCH (BEBEDOR VOLUNTÁRIO DE ETANOL A 10%)**. Após ser versado para o inglês será submetido para publicação no periódico *Reproduction, Fertility and Development*.

Efeitos da separação materna e do alcoolismo no epidídimo de ratos UCh
(bebedor voluntário de etanol a 10%)

¹*Department of Anatomy, IB - UNESP, Botucatu - SP, Brazil*

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

e-mail: giovana@ibb.unesp.br

Funded by: Foundation for Research Support of São Paulo (FAPESP); Grant number: 2005/04712-1.

Resumo: Experiências traumáticas na infância estão associadas ao aumento do risco de abuso de álcool e de outras drogas na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse. A exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e, concomitantemente, reduz a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG). Estresses sociais e ambientais produzem efeitos prejudiciais na função reprodutiva. Pouco é conhecido sobre as relações entre o estresse, o alcoolismo e o epidídimo. Objetivo do trabalho foi avaliar se a separação materna (MS) potencializa os efeitos da ingestão de etanol sob aspectos morfofuncionais do epidídimo e sua regulação hormonal em ratos UCh. Foram avaliados a morfometria do epidídimo, o tempo de trânsito dos espermatozoides (TTE) e as concentrações hormonais de LH, FSH, testosterona, estrógeno e corticosterona. Há interação entre o etanol e a MS no epidídimo e na sua regulação hormonal. Conclui-se que a MS potencializa os efeitos da ingestão de etanol na morfofisiologia do epidídimo e no desequilíbrio das concentrações plasmáticas de LH e corticosterona em ratos UCh.

Palavras-chave: rato, separação maternal, álcool, epidídimo, UCh.

Introdução

O estresse social e o ambiental produzem efeitos prejudiciais na função reprodutiva (Wingfield & Sapolsky, 2003). No entanto, fatores estressantes diferentes produzem efeitos reprodutivos diversos, havendo respostas distintas a curto e em longo prazo. Sugere-se que eventos estressantes podem permanentemente alterar o sistema de resposta neural (estresse responsivo neural) e com isso aumentar a vulnerabilidade do indivíduo a desenvolver psicopatologias e dependências as drogas, como por exemplo, o uso abusivo de álcool na vida

adulta (Ploj *et al.*, 2003). Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse, incluindo prejuízo no desenvolvimento cerebral. Esses distúrbios podem ser a causa do aumento do risco do abuso de álcool (De Bellis, 2002; Roman *et al.*, 2004).

Exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e, concomitantemente, reduz a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) (Young & Korszun, 2002; Retana-Marquez *et al.* 2003). A especificidade dos efeitos do estresse na reprodução está relacionada com as diferentes espécies e com as diferenças sexuais em relação ao funcionamento do eixo HHG (Tilbrook *et al.*, 2000; Motzer & Hertig, 2004).

O eixo HHA está normalmente quiescente durante o período hiporresponsivo ao estresse (SHRP), do 4^o ao 14^o dia pós-natal, nos ratos. Nesse período, o rato neonato demonstra, aparentemente, pouca ou nenhuma resposta adrenocortical a estímulos estressores, o que no adulto resultaria em aumento significativo das concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona (Smith *et al.*, 1997; Yoshimura *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2003). No entanto, a privação materna pode estimular o eixo HHA, possibilitando ao rato neonato responder a fatores estressantes brandos. Essa experiência ambiental precoce (privação materna) pode conduzir a alterações permanentes da resposta ao estresse e ser fator significativo de risco de psicopatologias na vida adulta (Smith *et al.*, 1997; Levine, 2001; Lehmann *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2004).

A Separação Materna (MS) como modelo experimental de estresse para estudar os efeitos da relação materno-infante é aceita. Filhotes são separados da mãe durante período superior à uma hora individualmente ou em ninhadas no período neonatal. Essa ausência da mãe priva os filhotes de cuidados maternos essenciais ao desenvolvimento. Segundo Zimmerberg *et al.* (2003), esse modelo de estresse assemelha-se a negligência materna na

infância em humanos. A MS resulta na hiper-reatividade do eixo HHA no adulto (Newport *et al.*, 2002; Pryce & Feldon, 2003; Schmidt *et al.*, 2004; Macri & Würbel, 2006).

Resposta ao estresse induzida por mudanças físicas e emocionais altera as funções reprodutivas em machos (Retana-Marquez *et al.*, 1998; Rhees *et al.*, 1999). No entanto, a estrutura e a função do epidídimo frente a MS não foram descritas. Os espermatozóides testiculares não têm a habilidade completa para fertilização. A maturação espermiática, ou seja, a capacidade de fertilização, ocorre através do trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo (Hermo & Robaire, 2002). A integridade estrutural e funcional do epidídimo depende da testosterona e de outros fatores reguladores secretados pelo testículo (Robaire & Viger, 1995; Ezner & Robaire, 2002). Morfologicamente, o epidídimo pode ser dividido em quatro regiões anatômicas: segmento inicial (IS), cabeça (CT), corpo (CP) e cauda (CD). Ao longo dessas diferentes regiões, o epitélio epididimário é constituído de cinco tipos de células: principal, clara, basal, halo e *narrow* (Robaire & Hermo, 1998). A interação celular no epidídimo é necessária para a formação da barreira hemato-epididimária especializada entre as células epiteliais principais. A barreira cria microambiente único na luz do epidídimo essencial a maturação espermiática (Cyr *et al.*, 1995, 2003). Variações na população de células epiteliais, nos diâmetros tubular e luminal e na altura do epitélio são freqüentemente observadas nas diferentes regiões do epidídimo. À medida que se observa o aumento progressivo dos diâmetros do túbulo e da luz da região proximal em direção a distal, nota-se o inverso para a altura do epitélio (Robaire & Hermo, 1998).

As funções reprodutivas podem ser suprimidas pelo etanol em seres humanos, primatas e roedores (Kim *et al.*, 2003). O etanol atua como agente químico nocivo podendo promover a infertilidade masculina causando dano direto no armazenamento dos espermatozóides no epidídimo e na velocidade de progressão dos espermatozóides no sistema genital feminino (Anderson *et al.*, 1983). Pereira *et al.* (2003) observaram no epidídimo de

ratos submetidos à ingestão crônica de álcool desorganização estrutural epitelial, destacando-se dilatações das cisternas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi das células principais, aumento de gotas lipídicas nas células principais e claras, indicando alteração do metabolismo lipídico intermediário frente à ingestão de etanol. Os efeitos da administração prolongada de etanol em ratos UCh produzem significativas alterações morfofisiológicas no sistema genital masculino e no eixo HHG (Martinez *et al.*, 2000, 2002; Rissato *et al.*, 2003; Cândido *et al.*, 2006). Martinez *et al.* (2000) ao avaliarem a morfologia do epidídimo de ratos das linhagens UChA e UChB (bebedores voluntários de etanol) em relação à Wistar (controle) observaram atrofia no epitélio da cauda do epidídimo devido a diminuição da área citoplasmática.

As variedades UChA e UChB constituem modelos raros para estudos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool, tão bem quanto o apetite e tolerância que são importantes fatores do alcoolismo humano. Os ratos UChA e UChB foram selecionados da linhagem Wistar para o consumo de etanol, permanecendo como modelo importante para estudo dos efeitos da ingestão crônica de etanol (Mardones & Segovia-Riquelme, 1983; Mardones, 1993).

Experiências estressantes vividas precocemente refletem em fatores que podem potencializar ou não o uso abusivo de álcool e de outras drogas na vida adulta. Baseado nessas observações, o objetivo do trabalho foi avaliar se a separação materna potencializa os efeitos prejudiciais da ingestão de etanol sob aspectos morfofuncionais do epidídimo e sob as concentrações plasmáticas dos hormônios gonadotróficos, gonadais e da corticosterona em ratos UCh.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados doze casais de matrizes para cada linhagem. Os animais UChA e UChB foram provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP e os Wistar foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB, UNICAMP, Campinas-SP. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno medindo 40x30x15cm, com fundos sólidos, forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro), temperatura (20 à 25°C), sendo fornecida água filtrada e ração (Nuvital[®]) *ad libitum*.

Indução ao estresse por separação materna (Figura 1)

O dia do nascimento da ninhada foi estipulado como dia zero. As ninhadas foram padronizadas com oito filhotes com o número maior possível de machos. Os filhotes dos grupos experimentais foram separados da mãe diariamente, durante o Período Hiporresponsivo ao Estresse, ou seja, do 4º ao 14º dia de idade, sempre no mesmo horário. Durante a separação materna, os filhotes foram individualizados durante quatro horas (240 min) em caixas com oito divisões de 15cm de largura, 9cm de profundidade e 15cm de altura. O biotério onde os filhotes permaneceram durante o período de separação materna foi mantido isolado ao máximo de ruídos externos. As mãos do investigador foram lavadas em água corrente, secas e esfregadas na maravalha de forro das caixas da ninhada para evitar que cheiros estranhos chegassem aos filhotes, evitando rejeição da mãe à prole. Posteriormente, os filhotes foram devolvidos ao cuidado materno, retirando-se a mãe de sua caixa antes de retornar a prole. Os filhotes dos grupos controles não foram separados da mãe, apenas receberam os cuidados necessários de manejo para criação de animais de laboratório.

Seleção dos animais bebedores de etanol (Figura 1)

O desmame foi realizado aos 21 dias de idade, onde os filhotes machos foram agrupados em caixas contendo de dois a quatro animais, recebendo água e ração *ad libitum*. Aos 50 dias de idade, foi realizada a individualização dos animais em caixas. Aos 65 dias de idade os animais receberam além da garrafa de água *ad libitum*, uma garrafa contendo solução de etanol a 10%, sendo que ambas foram alternadas periodicamente. Após 15 dias de avaliação da ingestão de solução de etanol a 10%, ocorreu a seleção e a padronização das linhagens UChA e UChB (MARDONES & SEGOVIA-RIQUELME, 1983). Os animais que apresentaram consumo médio menor que 2,0mL de etanol/100g de peso corpóreo/dia foram selecionados para linhagem UChA. Os animais que apresentaram consumo médio maior ou igual que 2,0mL de etanol/100g de peso corpóreo/dia foram selecionados para linhagem UChB. Do fim do período da seleção até a eutanásia (80 aos 120 dias de idade), o consumo de etanol foi medido a cada 7 dias. Dessa forma, foram estabelecidos seis grupos de ratos machos: UChA controle e UChA MS, UChB controle e UChB MS, Wistar controle e Wistar MS. Os ratos das linhagens UChA e UChB permaneceram 55 dias consecutivos ingerindo voluntariamente solução de etanol a 10%. Esse intervalo de tempo supera o período de duração de um ciclo da espermatogênese no rato.

Microscopia de luz e análise da morfometria

Sete animais foram anestesiados com éter etílico e perfundidos com solução fixadora de Bouin através do ventrículo esquerdo do coração. Posteriormente, o epidídimo esquerdo foi dissecado, coletado e fixado em solução fixadora de Bouin por 24h, lavado em álcool 70%, desidratado, diafanizado, incluído em paraplástico e cortado com quatro micrômetros de espessura. Foram obtidas coleções de lâminas de cortes transversais corados com hematoxilina-eosina (HE) utilizadas na análise histológica e morfométrica. Foram realizadas medidas da altura do epitélio e dos diâmetros do túbulo e da luz nas nos segmentos inicial,

cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Para cada análise foram avaliadas duas lâminas, totalizando 16 secções transversais por animal. Para a altura do epitélio foram obtidas quatro medidas de um mesmo túbulo. As variáveis descritas foram analisadas através do programa de análise de imagens AxioVision (ZEISS) do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP.

Dosagens hormonais

Amostras de sangue de sete animais de cada grupo experimental foram coletadas após decapitação e as concentrações plasmáticas dos hormônios luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), testosterona (T), estradiol (E) e corticosterona (CORT) foram analisadas pelo método de rádio-imuno-ensaio de duplo-anticorpo. O exame foi realizado junto ao Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Os valores da concentração plasmática de LH, FSH, T e de CORT em ng/mL e de E em pc/mL.

Avaliação do tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo

Segundo a técnica descrita por ROBB *et al.* (1978), os epidídimos direitos após a coleta foram divididos em CT+CP e CD, pesados e congelados. No momento da avaliação do tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo, os segmentos CT+CP e CD foram preparados da seguinte forma: para cada 200mg de CT+CP foram adicionados 1mL de solução de STM (0,9% de NaCl e 0,05% de TritonX100 e 0,01% Trimerosal) e para cada 100mg de CD foram adicionados 1mL de STM. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas (homogeneizador Ultra-Turrax, marca Janke & Kunkel Ika-Werk com pistilo de 10N) e submetidas ao sonicador (Thornton-Inspec Eletrônica S/A na potência seis com 80 mA por segundos). Uma nova mistura do homogenato foi obtida pela diluição com STM na proporção de 1:20. A contagem do número de espermatozóides em cada segmento (CT+CP e CD) foi feita em câmara de Neubauer. Foram preparadas duas câmaras por animal divididas

em dois antímeros e contados cinco campos por antímero. O tempo de trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo foi calculado, dividindo-se o número de espermatozóides pelo valor obtido da produção diária de espermatozóides de cada animal.

Análise estatística

O estudo estatístico das variáveis descritas foi realizado através da ANOVA e complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey para contraste entre médias dos tratamentos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos, sendo todas as conclusões estatísticas realizadas com 5% de significância. Detalhes a respeito da metodologia empregada podem ser encontrados em BANZATTO & KRONKA (1989).

Resultados

Consumo de álcool

Nas linhagens UChA e UChB, o consumo de etanol diário, durante o período de tratamento, foi significativamente maior nos grupos da linhagem UChB comparado a linhagem UChA. O consumo diário de etanol entre os grupos (controle e MS) não apresentou diferença significativa (Tabela 1).

Análise morfométrica do epidídimo

Nas linhagens (UChA, UChB e Wistar) com seus respectivos grupos (controle, separação materna), a altura do epitélio nas regiões do epidídimo não apresentou diferença significativa. A altura do epitélio na região da cabeça do epidídimo foi significativamente maior na linhagem

UChA com MS comparada a UChB. Para todas as linhagens, foi observada diminuição da altura epitelial do segmento inicial em direção a cauda do epidídimo (Tabela 2).

Os diâmetros da luz e do túbulo do epidídimo no IS não apresentou diferença significativa nos grupos (controle e MS) de cada linhagem (UChA, UChB e Wistar). O grupo MS da linhagem UChB apresentou os diâmetros no SI significativamente maior comparado com os demais grupos das linhagens (Tabela 3 e 4).

Na região de CT do epidídimo, os diâmetros da luz e do túbulo foi significativamente maior no grupo MS da linhagem UChB comparado ao controle. Avaliando-se os grupos controles, a linhagem UChA apresentou os diâmetros significativamente maior comparada com a linhagem UChB, sendo que a linhagem Wistar mostrou-se similar as demais linhagens (Tabela 3 e 4).

Os diâmetros da luz e do túbulo na região do CP do epidídimo apresentou-se significativamente maior no grupo MS da linhagem UChB comparado ao controle. Os grupos MS das linhagens UChA e Wistar mostraram-se similares na avaliação dos diâmetros, no entanto, apresentaram diferença significativa maior em relação ao grupo MS da linhagem UChB. Na avaliação dos grupos controle, observou-se diferença significativa. A linhagem Wistar apresentou o maior valor do diâmetro da luz e do túbulo. (Tabela 3 e 4).

Na linhagem UChA, os diâmetros na região da CD foi significativamente maior no grupo controle em relação ao MS. Comparando-se os grupos controles, a linhagem UChA apresentou valor significativamente maior em relação a UChB, sendo a linhagem Wistar similar às linhagens UChA e UChB. Na avaliação dos grupos MS, não houve diferença significativa. Para todas as linhagens foi observado aumento de diâmetro proporcional da região do IS para a CD (Tabela 3 e 4).

Massas corporal e epididimária

A massa corporal (MC) dos animais da linhagem UChB que sofreram MS foi significativamente maior comparada ao controle. O grupo controle da linhagem UChB apresentou MC significativamente menor comparada as linhagens UChA e Wistar. Na linhagem Wistar, registrou-se MC significativamente maior no grupo MS em relação aos grupos MS das demais linhagens (Tabela 5).

A massa do epidídimo esquerdo (MEE) do grupo MS da linhagem UChA foi significativamente maior comparada ao controle. Não ocorreu diferença significativa entre os grupos controle e MS das linhagens UChB e Wistar (Tabela 5).

Na análise da massa da cabeça+corpo (MCA+CO ED) do epidídimo direito, observou-se diferença significativamente maior no grupo MS das linhagens UChA e UChB em relação aos seus respectivos controles. O grupo controle da linhagem Wistar apresentou massa da cabeça+corpo significativamente maior comparada a linhagem UChA, sendo o grupo MS UChB similar aos grupos MS UChA e Wistar (Tabela 5).

Analisando os grupos de cada linhagem, os animais que sofreram MS das linhagens UChB e Wistar apresentaram diferença significativamente maior na massa da cauda (MCD ED) do epidídimo comparado ao controle (Tabela 5).

A massa total do epidídimo direito (MTED) dos animais que sofreram MS das linhagens UChA e UChB foram significativamente maiores comparado aos seus respectivos controles. Não houve diferença significativa na comparação dos grupos entre as linhagens (Tabela 5).

Os índices EE/MC e ED/MC do grupo MS UChA apresentaram-se significativamente maiores em relação ao seu controle. No entanto, o grupo MS Wistar mostrou índices menores comparado com os grupos MS das demais linhagens. Para os mesmos índices, registrou-se

valores significativamente maiores no grupo controle UChB em relação aos controles das demais linhagens (Tabela 5).

Número de espermatozóides e tempo de trânsito no epidídimo

Na análise do número de espermatozóides na CT+CP do epidídimo, o grupo SM UChB apresentou média significativamente maior em relação ao controle. O padrão de resposta da avaliação do número de espermatozóides na cabeça+corpo do epidídimo nos grupos controles apresentou-se igual para as linhagens UChA e Wistar e menor para a UChB (Tabela 6).

O tempo de trânsito de espermatozóides na CT+CP do epidídimo foi significativamente maior no grupo MS UChB comparado ao controle. Para esse mesmo parâmetro, os grupos controles apresentaram da seguinte forma UChA=Wistar>UChB (Tabela 6).

A análise simultânea do TTE e do número de espermatozóides na CD do epidídimo revelou-se ser significativamente maior no grupo MS UChB em relação ao controle. Quando comparados os controles, verificou-se que o TTE e o número de espermatozóides foram significativamente menores na linhagem UChB em relação as demais linhagens. Na análise dos grupos MS, o TTE e o número de espermatozóides na CD do epidídimo não apresentaram diferenças significativas (Tabela 6).

Os animais do grupo MS UChB apresentaram tempo total de trânsito (TTTE) de espermatozóides no epidídimo significativamente maior comparado ao controle. O padrão para o TTTE nos grupos controles apresentou-se significativamente maior para a linhagem UChA, sendo UChA>Wistar>UChB (Tabela 6).

Dosagem hormonal

A concentração plasmática de LH foi significativamente maior no grupo MS UChA ($2,0 \pm 0,6$) em relação ao seu controle ($0,7 \pm 0,3$). Na avaliação dos níveis plasmáticos de LH, observou-se que o grupo MS UChA apresentou os maiores valores em relação aos demais grupos (Figura 2).

As concentrações plasmáticas de estrógeno, FSH e testosterona não apresentaram diferença significativa entre os grupos e linhagens (Figura 3).

A CORT plasmática mostrou-se significativamente maior no grupo MS ($67,2 \pm 9,4$) da linhagem UChB comparado ao controle ($30,3 \pm 7,4$). No entanto, o grupo controle Wistar ($46,5 \pm 11,3$) apresentou maior média para as concentrações plasmáticas de CORT em relação ao grupo MS Wistar ($18,3 \pm 5,8$). Os grupos MS mostraram as concentrações plasmáticas de CORT diferentes para as linhagens UChB ($67,2 \pm 9,4$) e Wistar ($46,5 \pm 11,3$), no entanto, a linhagem UChA ($39,2 \pm 14,7$) apresentou padrão similar tanto em relação a linhagem UChB quanto na Wistar (Figura 1).

Discussão

Estudos demonstram que a MS de longa duração durante a fase neonatal de roedores determina variações neurobiológicas e comportamentais no indivíduo adulto (Hall, 1998; Ladd *et al.*, 2000). Experimentos com ratos que utilizaram como o modelo de estresse a manipulação neonatal (*early handling*) e a MS verificaram que ratos expostos a MS consumiam maior quantidade de etanol comparada com animais manipulados (Huot, *et al.*, 2001; Ploj *et al.*, 2003; Gustafsson *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2003, Roman, *et al.*, 2005). Neste experimento repetidos eventos de MS realizados do 4º ao 14º dia não provocaram alterações na ingestão de etanol entre os grupos controle e MS, mantendo-se o padrão característico de

seleção das linhagens de ratos UChA (com baixa preferência por álcool) e UChB (alta preferência por álcool) sob as condições experimentais. Esses animais diferem quanto à atividade cerebral da enzima aldeído desidrogenase e na capacidade de desenvolver tolerância aguda ao etanol. Ao respeitar o padrão adotado para a seleção das linhagens (Mardones, 1987), pode-se ter excluído dos grupos experimentais animais que desenvolveram alta preferência de etanol devido ao desequilíbrio causado pelo estresse da MS.

Variações regionais relacionadas aos diâmetros luminal e tubular e a altura de epitélio foram observadas ao longo do ducto epididimário nos grupos de cada linhagem estudada. O diâmetro luminal foi maior no segmento inicial e diminuiu em direção a cauda do epidídimo e o inverso ocorreu com relação à altura do epitélio. Os dados observados seguiram padrão semelhante entre as linhagens. Esses resultados concordam com os descritos para o rato marrom (Serre & Robaire, 1998), para o rato Sprague-Dawley (Tuner & Riley, 1999), para os ratos Wistar (Markey *et al.*, 1992), onde se observa o aumento do diâmetro luminal e tubular e a diminuição da altura do epitélio segmento inicial para a cauda epididimária (Serre & Robaire, 1998; Miller & Killian, 1987). Segundo Robaire & Hermo (1988), o diâmetro luminal epididimário torna-se mais dilatado distalmente e a altura epitelial decresce devido à função de estocagem dos espermatozóides na cauda. A altura do epitélio de revestimento da cauda do epidídimo nos grupos estudados manteve-se baixa, favorecendo o aspecto compensativo esperado para a dilatação luminal e tubular nesta região de estocagem dos espermatozóides.

Na literatura científica especializada, encontram-se vários estudos experimentais relacionando o alcoolismo crônico com o decréscimo no peso corpóreo e nos índices dos órgãos de animais tratados com etanol em relação aos controles (Oliva *et al.*, 2006; Cagnon *et al.*, 1996; Ratcliffe, 1972; Cicero & Badger, 1977; De Oliveira & Ferreira, 1987). Os resultados do presente trabalho demonstram que a massa corpórea do grupo UChB controle

foi menor comparada com o grupo UChB SM. Segundo Ratcliffe (1972) o decréscimo no ganho de peso de animais que consomem álcool pode ser gerado pela irritação causada no trato gastrointestinal, determinando o baixo consumo de ração e ingestão de água, levando ao quadro de desnutrição. Além disso, a redução no ganho de massa corpórea pode também estar relacionada a mecanismos envolvidos com a redução na produção dos níveis normais de testosterona endógena, com excessiva conversão de testosterona em estradiol e com o aumento da oxidação lipídica (Hickson *et al.*, 1986, Ryan, 1981, Guzman *et al.*, 1991). Conclui-se que exista relação entre a redução no ganho de massa corpórea com os níveis plasmáticos de testosterona. Os resultados demonstraram que as concentrações baixas de testosterona coincidem com os baixos níveis de registro da massa corpórea, sendo Wistar>UChA≥UChB.

Na observação dos dados de massa do epidídimo esquerdo, do epidídimo direito íntegro e das secções CT+CP e CD do epidídimo direito evidenciou-se interação entre MS e o consumo de etanol, pois os ratos UCh dos grupos experimentais MS mostraram tendência de aumento da massa em relação aos seus respectivos controles.

Na avaliação do tempo de trânsito total, registrou-se para a linhagem UChB o menor valor. Essa observação coincidiu com a concentração baixa plasmática de testosterona e com a diminuição nos diâmetros tubular e luminal na maioria das regiões estudadas. No entanto, pôde-se observar que o tempo de trânsito total do grupo controle da linhagem UChA foi significativamente maior em relação aos demais grupos controles, sendo acompanhado também pelo aumento dos diâmetros na maioria das regiões. Acredita-se que os resultados estejam relacionados com a afinidade das células epiteliais do epidídimo pela testosterona, o que implicaria na expressão diminuída dos receptores de LH (Lei, *et al.*, 2003). Oliva *et al.* (2006) também observaram tempo acelerado de trânsito dos espermatozóides em ratos Wistar adultos submetidos a altas doses de etanol desde a puberdade. Lau *et al.* (1996) não

encontraram diferenças no tempo de trânsito dos espermatozoides entre os grupos controles e privados maternos. Na linhagem UChB, foi evidente a ação da MS aproximando os resultados com os da linhagem sem consumo de etanol (Wistar) e com os resultados encontrados na literatura (Kempinas *et al.*, 1998; Robb *et al.*, 1987; Fernandes *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 1996).

Segundo Rivier & Riviest (1991) uma das conseqüências do estresse é a interrupção das funções reprodutivas nos mamíferos. O estresse é acompanhado pelo aumento da atividade do eixo HHA e pelo decréscimo na atividade do eixo HHG (Selye, 1939). É sugerido uma regulação hormonal entre os eixos HHA e o HHG. Os hormônios relacionados ao estresse, como por exemplo, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e os corticoesteróides adrenais podem influenciar a função reprodutiva em todos os três níveis do eixo HHG (Rivier & Riviest, 1991). Vreeburg & DeGreef (1984) relataram que altas concentrações de CORT no soro de ratos aumentam a sensibilidade dos efeitos da retroalimentação negativa da testosterona e inibem as funções testiculares. Nesse experimento, o álcool e a hiper-reatividade do eixo HHA à MS atuaram no aumento dos níveis de CORT em relação aos níveis observados nos animais controles, concordando com os dados atuais da literatura científica especializada.

Cícero (1981), ao avaliar os efeitos neuroendocrinológicos do álcool, documentou que há supressão da atividade do eixo HHG. Considera-se que o álcool exerça efeito no hipotálamo deprimindo a liberação do hormônio liberador de LH (LHRH), resultando na diminuição dos níveis plasmáticos de LH e de testosterona nos testículos, inibindo diretamente a biossíntese de testosterona (Adams & Cícero, 1991). No presente trabalho, observou-se para os grupos MS UCh interação entre a MS e o consumo crônico de etanol em relação às concentrações plasmáticas de LH. Registrou-se aumento dos níveis de LH nos grupos SM UCh em relação aos grupos submetidos a MS. O efeito supressor do álcool sobre o

eixo HHG foi observado no grupo controle UChB comparado ao grupo controle Wistar, concordando com o perfil esperado de ação do álcool (Adams & Cícero, 1991).

O padrão observado das concentrações plasmáticas de testosterona entre as linhagens e os grupos estudados não apresentou diferenças significativas. No entanto, observou-se tendência de diminuição da testosterona nas linhagens UChA e UChB em relação à linhagem Wistar. A tendência aponta o efeito supressor do etanol sobre a testosterona.

Conclusão

Há interação entre a separação materna e a ingestão de etanol sobre o epidídimo, levando ao desequilíbrio nos eixos reguladores HHA e HHG observado através das alterações das concentrações plasmáticas de LH e CORT em ratos.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos: 04/10661-5; 05/04194-8) e do Centro Nacional de Pesquisa (CNPq processo: 470297/2004-2).

Referências

- Adams, M. L., and Theodore J., Cícero, T. J. (1991). Effects of Alcohol on, β Endorphin and Reproductive Hormones in the Male Rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **15**, 685-692.
- Anderson Jr, R.A., Willis, B.R, Oswald, C., Zaneveld, L.J. (1983). Male reproductive tract sensitivity to ethanol: a critical overview. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **18**, 305-310.
- Banzatto, A. D., Kronka, S. N. (1989). Experimentação agrícola. Jaboticabal: *Funep*, 247.
- Boyden, T. W., Pamentor, R. W. (1983). Effects of ethanol on male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocr. Rev.*, **4**, 389-95.
- Cagnon, V. H., Garcia, P. J., Martinez, F. E., Martinez, M., Padovani, C. R. (1996). Ultrastructural study of the coagulating gland of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *Prostate*, **28**, 341-6.
- Cândido, E. M., Carvalho, C. A. F., Martinez, F. E., Cagnon, V. H. A. (2006). Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell. Bio.l Int.*, 1-14.

- Cicero, T. J., Badgerm, T. M. (1977). Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **201**, 427- 33.
- Cicero, T. J. (1981). Neuroendocrinological effects of alcohol. *Ann. Ver. Med.*, **32**, 123-142.
- Cyr, D. G., Dufresne, J., Gregory, M. (2003). Intercellular communication and tubule integrity. In 'The Third International Conference on the Epididymis'. (Eds B.T. Hinton. T.T. Turner.) pp. 50–59 (Charlottesville, VA: The Van Doren Co.)
- Cyr, D. G., Robaire, B., Hermo, L. (1995). Structure and turnover of the junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc. Res. Tech.*, **30**, 54–66.
- De Bellis, M. D. (2002). Developmental traumatology: a contributory mechanism for alcohol and substance use disorders. *Psychoneuroendocrinology*, **27**, 155-70.
- De Oliveira, C., Ferreira, A. (1987). Effect of alcohol on the rat juxtaprostatic pelvic ganglia and gonads. *Gegenbaurs Morphol Jahrb.*, **133**, 771-80.
- Ezner, N., Robaire, B. (2002). Androgenic regulation of the structure and functions of the epididymis. In 'The epididymis: from molecules to clinical practice'. (Eds B. Robaire. B. Hinton.) pp. 297–316 (New York: Plenum Press.)
- Fernandes, G. S. A., Arena, A. C., Fernandez, C. D. B., Mercadante, A., Barbisan, L. F., Kempinas, W. G. (2007). Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology*, **23**, 106–112.
- Gustafsson, L., Zhou, Q., and Nylander, I. (2007). Ethanol-induced effects on opioid peptides in adult male wistar rats are dependent on early environmental factors. *Neuroscience*, **146**, 1137–1149.
- Guzmán, M., Saborido, A., Castro, J., Molano, F., Meigas. (1991). Treatment with anabolic steroids increases the activity of the mitochondrial outer carnitin palmitoyltransferase in rat liver and fast-twitch muscle. *Biochem. Pharm.*, **41**, 833-5.
- Hall, F. S. (1998). Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Critical Reviews in Neurobiology*, **12**, 129–162.
- Herme, L., Robaire, B. (2002) Epididymal cell types and their functions. In 'The epididymis: from molecules to clinical practice'.(Eds B. Robaire. B. Hinton.) pp. 81–102 (New York: Plenum Press.)
- Hickson, R. C., Kurowski, T. G. (1986). Anabolic steroids and training. *Clin. Sports. Med.*, **3**, 461-9.
- Huot, R. L., Thivikraman, K. V., Meaney, M. J., Plotsky, P. M. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in

- Long-Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*, **158**, 366–373.
- Kempinas, W. G., Suarez, J. D., Roberts, N. L., Strader, L. F., Ferrell, J., Goldman, J. M., Narotsky, M. G., Perreault, S. D., Evenson, D. P., Ricker, D.D., and Klinefelter, G. R. (1998). Fertility of Rat Epididymal Sperm after Chemically and Surgically Induced Sympathectomy. *Biology of reproduction*, **59**, 897–904.
- Kim, J. H., Kim, H. J., Noh, H. S., Roh, G. S., Kang, S.S., Cho, G. J., Park, S. K., Lee, B. J., Choi, W. S. (2003). Suppression by ethanol of male reproductive activity. *Brain Research*. **989**, 91–98.
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Meaney, M. J., & Plotsky, P. M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Progress in Brain Research*, **122**, 81–103.
- Lau, C., Klinefelter, G., and Cameron, A. M. (1996). Reproductive Development and Functions in the Rat after Repeated Maternal Deprivation Stress. *Fundamental and applied toxicology*, **30**, 298–301.
- Lehmann, J., Russig, H., Feldon, J., Pryce, C. R. (2002). Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, **73**, 141-5.
- Lei, Z. M., Zou, W., Mishra, S., Li, X., Rao, C. V. (2003). Epididymal phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and its response to testosterone replacement therapy. *Biology of Reproduction*, **68**, 888-895.
- Levine, S. (2001). Primary social relationship influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.*, **73**, 255-60.
- Macri, S., Würbel, H. (2006). Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior*, **50**, 667–680.
- Mardones, J. (1993). Es la predisposición genética al alcoholismo una perturbación del mecanismo de la saciedad de alcohol? *El Pensamiento de los Premios Nacionales de Ciencia*, 19-34.
- Mardones, J., Segovia-Riquelme, N. (1983). Thirty-Two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, **5**, 171-178.
- Markey, C. M., and Meyer, G. T. (1992). A quantitative description of the epididymis and its microvasculature: an age-related study in the rat. *J. Anat.* **180**, 255-262.

- Martinez, F. E., Martinez, M., Padovani, C. R., Bustos-Obregon, E. (2000). Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **32**, 175-84.
- Martinez, F. E., Martinez, M., Quitete, V. H. A. C, Mello JR. W., Padovani, C. R. (2002). Alcoolismo, Reprodução e Genética. *Veterinária Notícias*, **8**, 121-30.
- Miller, R. J., and Killian, G. J. (1987). Morphometric Analyses of the Epididymis from Normal and Vasectomized Rats. *J Androl*, **8**, 279-291.
- Motzer, S. A., Hertig, V. (2004). Stress, stress and health. *Nursing Clinics of North America*, **39**, 1-17.
- Newport, J. D., Stowed, Z. N., Nemerof, C. B. (2002). Parental depression: animal models of an adverse live event. *Am. J. Psychiatry*, **159**, 1265-83.
- Oliva, S. U., Messias, A. G., Silva, D. A. F., Pereira, O. C. M., Gerardin. D. C.C., Kempinas, W.G. (2006). Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reproductive Toxicology*, **22**, 599–605.
- Pereira, M. A. S., Orsi, A. M., Molinari, S. L. and Garcia, P. J. (2003). Alcohol Effects on the Principal and Clear Cells of the Caput Epididymis of Albino Rats *Anat. Histol. Embryol.* **32**, 17–20.
- Ploj, K., Roman, E., Nylander, I. (2003). Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience*, **121**, 787-99.
- Pryce, C. R., Feldon, J. (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **27**, 57-71.
- Ratcliffe, F. (1972). The effect of chronic ethanol administration on the growth of rats. *Arch. Int. Pharmacodyn*, **197**, 19-30.
- Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., and Velazquez-Moctezuma, J. (1998). Lack of Effect of Corticosterone Administration on Male Sexual. *Behavior of Rats Physiology & Behavior*, **63**, 367–370.
- Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R., Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones & Behavior*, **44**, 327-337.
- Rhees, R. W., Al-Saleh, H. N., Edward W. Kinghorn, E. W., Donovan E. Fleming, D. E., and Edwin D. Lephart, E. D. (1999). Relationship between sexual behavior and sexually

- dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. *Brain Research Bulletin*, **50**, 193–199.
- Rissato, J. H., Ietsugu, M.V., Almeida, C. C., Pinheiro P. F., Segatelli T. M., Martinez, M., Padovani, C.R., Junior, W. M., Quitete, V. H., Martinez, F. E. (2003). Morphology of the vas deferens in an ethanol-drinking strain of rats (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **35**, 331-341.
- River, C. Riviest, S. (1991). Effect of stress on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: periferal and central mechanisms. *Biol. Reprod.* **45**, 523-532.
- Robaire, B., and Viger, R. S. (1995). Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biology of Reproduction*, **52**, 226-236.
- Robb, G. W., Amann, R. P., Killian, G. J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adults rats. *J. Repr. Fert.* **54**, 103-107.
- Roman, E., Gustafsson, L., Hyytiä, P., Nylander, I. (2005). Short and Prolonged Periods of Maternal Separation and Voluntary Ethanol Intake in Male and Female Ethanol-Preferring AA and Ethanol-Avoiding ANA Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **29**, 591–601.
- Roman, E., Ploj, K., Nylander, I. (2004). Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol*, **33**, 31-9.
- Ryan, A. J. (1981). Anabolic Steroids are fool's gold. *Federation Proceedings*; **12**, 2682-8.
- Schmidt, M., Enthoven, L., Van Der Mark, M., Levine, S., De Kloet, E. R., Oitzl, M. S. (2003). The postnatal development of the hypothalamic-adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **21**, 125-32.
- Schmidt, M., Enthoven, L., Van Woezik, J.H., Levine, S., De Kloet, E.R., Oitzl, M.S. (2004). The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *Journal of Neuroendocrinology*, **16**, 52-57.
- Selye, H. (1939). Effect of adaptation to various damaging agents on the female sex organs in the rat. *Endocrinology*, **25**, 615-624.
- Serre, V., Robaire, B. (1998). Segment –specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biology of Reproduction*, **58**, 497-513.
- Smith, M. A., Kim, S., Van Oers, H. J. J., Levine, S. (1997). Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*, **138**, 4622-8.
- Tilbrook, A. J., Turner, A. I., Clarke, I. J. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction*, **5**, 105-13.

- Tohei, A., Tomabechi, T., Mamada, M., Akay, M., Watanabe, G., Taya, K. (1997). Effects of the repeated ether stress on the hypothalamic-pituitary-testis axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. *J. Vet. Med. Sci.* **59**, 329-334.
- Turner, T. T., and Riley, T. A. (1999). p53 Independent, Region-Specific Epithelial Apoptosis Is Induced in the Rat Epididymis by Deprivation of Luminal Factors. *Molecular reproduction and development*, **53**, 188–197.
- Vreeburg, J. T. M., DeGreef, W. J., Ooms, M. P., VanWouw, P., and Weber, R. F. A. (1984). Effects of adrenocorticotropin and corticosterone on the negative feedback action of testosterone in the adult male rat. *Endocrinology*. **115**, 977-983.
- Wingfield, J. C., Sapolsky, R. M. (2003). Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinology*, **15**, 711-24.
- Yoshimura, S., Sakamoto, S., Kudo, H., Sassa, S., Kumai, A., Okamoto, R. (2003). Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*, **68**, 439-45.
- Young, E. A., Korszun, A. (2002). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in mood disorders. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, **31**, 63-78.
- Zimmerberg, B., Kim, J. H., Davidson, A. N., Rosenthal, A. J. (2003). Early deprivation alters the vocalization behavior of neonates directing maternal attention in a rat model of child neglect. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1008**, 308-313.

Tabela 1

Média \pm erro padrão do consumo de etanol (g/kg/dia) no intervalo de 80 a 120 dias de idade segundo as linhagens (UChA, UChB e Wistar) e os grupos (controle e MS).

Linhagens	Grupos	Consumo de etanol (g/Kg/dia)
UChA	Controle	2,1 \pm 0,2 a ¹ A ²
	MS	1,7 \pm 0,2aA
UChB	Controle	6,5 \pm 0,5aB
	MS	7,0 \pm 0,5aB

¹ comparação dos grupos (controle e SM) fixando a linhagem.

² comparação entre as linhagens fixando o grupo.
(p<0,05)

Tabela 2

Médias \pm erro padrão da altura (μm) do epitélio das regiões do epidídimo (SI, CT, CP e CD) segundo as linhagens (UChA, UChB e Wistar) e os grupos (controle e MS).

Linhagens	Grupos	Regiões do epidídimo			
		IS	CT	CP	CD
UChA	Controle	39,56 \pm 1,0a ¹ A ² γ ³	19,04 \pm 0,4 aA β	19,04 \pm 0,4 aA β	14,92 \pm 0,6aA α
	MS	40,62 \pm 0,9aA γ	21,23 \pm 0,4 aB β	19,21 \pm 0,3 aA β	14,78 \pm 0,2aA α
UChB	Controle	37,93 \pm 1,4aA γ	19,67 \pm 0,4 aA β	18,70 \pm 0,8aA β	14,91 \pm 0,5aA α
	MS	39,91 \pm 0,8aA γ	18,81 \pm 0,7 aA β	18,58 \pm 0,6aA β	14,17 \pm 0,2aA α
Wistar	Controle	39,56 \pm 1,4aA γ	20,23 \pm 0,6 aA β	18,71 \pm 0,4aA β	14,13 \pm 0,6aA α
	MS	37,71 \pm 0,9aA γ	19,77 \pm 0,7 aAB β	18,54 \pm 0,5aA β	13,88 \pm 0,5aA α

¹ comparação dos grupos (controle e SM) fixando a linhagem e a região do epidídimo.

² comparação entre as linhagens fixando o grupo e região do epidídimo.

³ comparação entre as regiões do epidídimo fixando a linhagem e o grupo.

p<0,05

Tabela 3

Médias \pm erro padrão do diâmetro (μm) da luz das diferentes regiões do epidídimo (SI, CT, CP e CD) segundo as linhagens (UChA, UChB e Wistar) e os grupos (controle e MS).

Linhagens	Grupos	Regiões do epidídimo			
		IS	CT	CP	CD
UChA	Controle	155,36 \pm 3,6a ¹ A ² α^3	311,74 \pm 7,5aB β	302,51 \pm 3,8aB β	388,20 \pm 9,8bB γ
	MS	164,48 \pm 7,7aA α	309,21 \pm 2,5 aA β	313,11 \pm 8,5aB β	359,08 \pm 6,3aA γ
UChB	Controle	168,02 \pm 15,6aA α	277,97 \pm 7,4aA β	270,55 \pm 4,3aA β	327,28 \pm 15,9aA γ
	MS	187,72 \pm 11,6aB α	294,43 \pm 5,1bA β	285,49 \pm 5,3bA β	353,49 \pm 10,5aA γ
Wistar	Controle	136,68 \pm 5,7aA α	298,06 \pm 7,1aA β	326,29 \pm 4,7aC γ	351,90 \pm 8,9aA β
	MS	143,71 \pm 5,6aA α	310,49 \pm 8,3aA β	323,92 \pm 4,3 aB β	365,29 \pm 13,7aA γ

¹ comparação dos grupos (controle e SM) fixando a linhagem e a região do epidídimo.

² comparação entre as linhagens fixando o grupo e região do epidídimo.

³ comparação entre as regiões do epidídimo fixando a linhagem e o grupo.

p<0,05

Tabela 4

Médias \pm erro padrão do diâmetro (μm) do túbulo das diferentes regiões do epidídimo (SI, CT, CP e CD) segundo as linhagens (UChA, UChB e Wistar) e os grupos (controle e MS).

Linhagens	Grupos	Regiões do epidídimo			
		IS	CT	CP	CD
UChA	Controle	243,56 \pm 3,0a ¹ A ² α ³	360,36 \pm 6,8aB β	357,61 \pm 4,3 aB β	427,17 \pm 11,1bB γ
	MS	251,71 \pm 7,4aAB α	356,98 \pm 3,7 aA β	368,48 \pm 9,7aB β	396,92 \pm 6,1aA γ
UChB	Controle	253,37 \pm 19,1aA α	323,96 \pm 6,6aA γ	323,65 \pm 3,6aA γ	364,98 \pm 15,6aA γ
	MS	274,73 \pm 10,2 aB α	339,97 \pm 5,9bA β	335,86 \pm 5,5bA β	392,17 \pm 10,4aA γ
Wistar	Controle	222,63 \pm 6,1aA α	348,76 \pm 8,4aAB β	380,55 \pm 4,1 aC γ	388,81 \pm 8,4aAB γ
	MS	226,18 \pm 4,7aA α	359,47 \pm 8,1aA β	376,08 \pm 5,2aB β γ	400,43 \pm 13,20aA γ

¹ comparação dos grupos (controle e SM) fixando a linhagem e a região do epidídimo.

² comparação entre as linhagens fixando o grupo e região do epidídimo.

³ comparação entre as regiões do epidídimo fixando a linhagem e o grupo.

p<0,05

Tabela 5

Médias \pm erro padrão das massas do corpo (g), dos epidídimos esquerdo e direito (g), da cabeça e corpo do epidídimo direito (g), da cauda do epidídimo direito (g), dos índices relativos do epidídimo esquerdo e direito, segundo as linhagens (UChA, UChB e Wistar) e os grupos (controle e SM).

Parâmetros avaliados	UChA		UChB		Wistar	
	Controle	MS	Controle	MS	Controle	MS
MC	371,1 \pm 4,7a ¹ B ²	364,0 \pm 4,9aA	315,7 \pm 10,2aA	350,0 \pm 13,2bA	385,0 \pm 9,9aB	398,2 \pm 8,9aB
MEE	0,49 \pm 0,01aA	0,54 \pm 0,004bA	0,47 \pm 0,03aA	0,53 \pm 0,03aA	0,52 \pm 0,01aA	0,54 \pm 0,02aA
M CT+CP do ED	0,28 \pm 0,01aA	0,31 \pm 0,01bA	0,30 \pm 0,02aAB	0,34 \pm 0,02bA	0,34 \pm 0,01aB	0,33 \pm 0,01aA
M CD do ED	0,23 \pm 0,01aA	0,24 \pm 0,01aA	0,20 \pm 0,02aA	0,25 \pm 0,01bA	0,23 \pm 0,004aA	0,25 \pm 0,01bA
M TED	0,51 \pm 0,01aA	0,55 \pm 0,01bA	0,50 \pm 0,03aA	0,59 \pm 0,02bA	0,56 \pm 0,01aA	0,58 \pm 0,02aA
EE/MC	0,13 \pm 0,002aA	0,15 \pm 0,001bB	0,15 \pm 0,01aB	0,15 \pm 0,01aB	0,13 \pm 0,01aA	0,13 \pm 0,004aA
EDT/MC	0,14 \pm 0,003 aA	0,16 \pm 0,002bB	0,16 \pm 0,01aB	0,17 \pm 0,01aB	0,14 \pm 0,01aA	0,14 \pm 0,01aA

Legenda: MC: massa corporal; MEE: massa do epidídimo esquerdo; CT+CP do ED: massa da cabeça+corpo do epidídimo direito; M TED: massa total do epidídimo direito; EE/MC índice de massa do epidídimo esquerdo; EDT/MC índice de massa do epidídimo direito total. ¹Comparação dos grupos (controle e MS) fixado a linhagem. ²Comparação entre as linhagens fixado o grupo. p<0,05.

Tabela 6

Médias \pm erro padrão do tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo (10^6), do número de espermatozoide $\times 10^6$ / cabeça+corpo, do número de espermatozoide $\times 10^6$ /g/ cabeça+corpo do epidídimo, tempo de trânsito (dias) pela cabeça+corpo epidídimo, do número de espermatozoide $\times 10^6$ / cauda do epidídimo, do número de espermatozoide $\times 10^6$ /g/ cauda do epidídimo, do tempo de trânsito (dias) pela cauda do epidídimo, segundo as linhagens (UChA, UChB e Wistar) e os grupos (controle e SM).

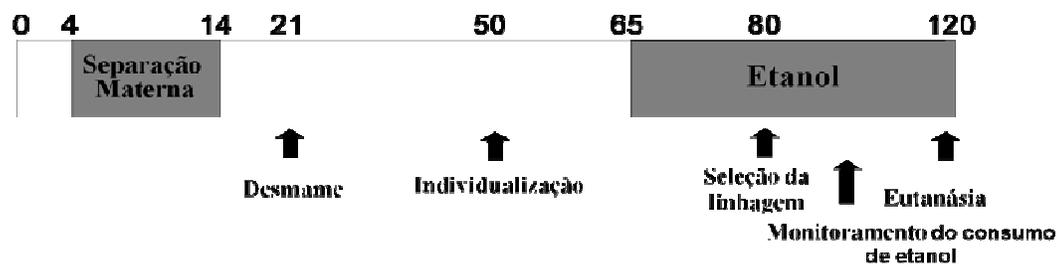
Variáveis	UChA		UChB		Wistar	
	Controle	MS	Controle	MS	Controle	MS
Cabeça /corpo epididimário						
Número ($\times 10^6$ / órgão)	97,79 \pm 4,4a ¹ B ²	100,03 \pm 4,4aA	68,73 \pm 9,8aA	94,79 \pm 5,5bA	102,81 \pm 7,5aB	104,77 \pm 9,7aA
Número ($\times 10^6$ /g/ órgão)	349,64 \pm 17,1aB	320,50 \pm 12,3aA	222,14 \pm 23,8aA	276,07 \pm 7,4bA	309,82 \pm 21,2aB	314,82 \pm 17,1aA
Tempo Transito (dias)	3,63 \pm 0,1aB	3,61 \pm 0,1aA	2,61 \pm 0,1aA	3,25 \pm 0,2bA	3,16 \pm 0,2aB	3,35 \pm 0,2aA
Cauda epididimário						
Número ($\times 10^6$ / órgão)	215,41 \pm 8,7aB	224,41 \pm 11,4aA	128,5 \pm 21,4aA	212,89 \pm 22,3bA	206,58 \pm 8,22aB	220,74 \pm 10,1aA
Número ($\times 10^6$ /g/ órgão)	945,71 \pm 21,4aB	933,50 \pm 45,5aA	610,36 \pm 63,9aA	841,79 \pm 70,1bA	901,43 \pm 32,4aB	889,29 \pm 39,8aA
Tempo Transito (dias)	8,02 \pm 1,3aB	8,24 \pm 0,8aA	4,85 \pm 0,5aA	7,30 \pm 0,9bA	6,49 \pm 0,5aB	7,19 \pm 0,5aA
Tempo total de trânsito (dias)	11,65 \pm 0,4aC	11,85 \pm 0,7aA	7,46 \pm 0,6aA	10,55 \pm 1,0bA	9,65 \pm 0,5aB	10,53 \pm 0,4aA

¹ comparação dos grupos (controle e SM) fixando a linhagem.

² comparação entre as linhagens fixando o grupo.

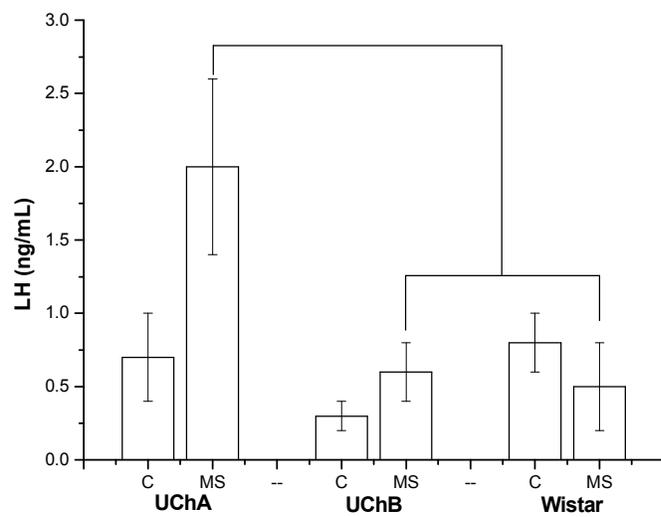
p<0,05

Figura 1



Representação esquemática do período experimental.

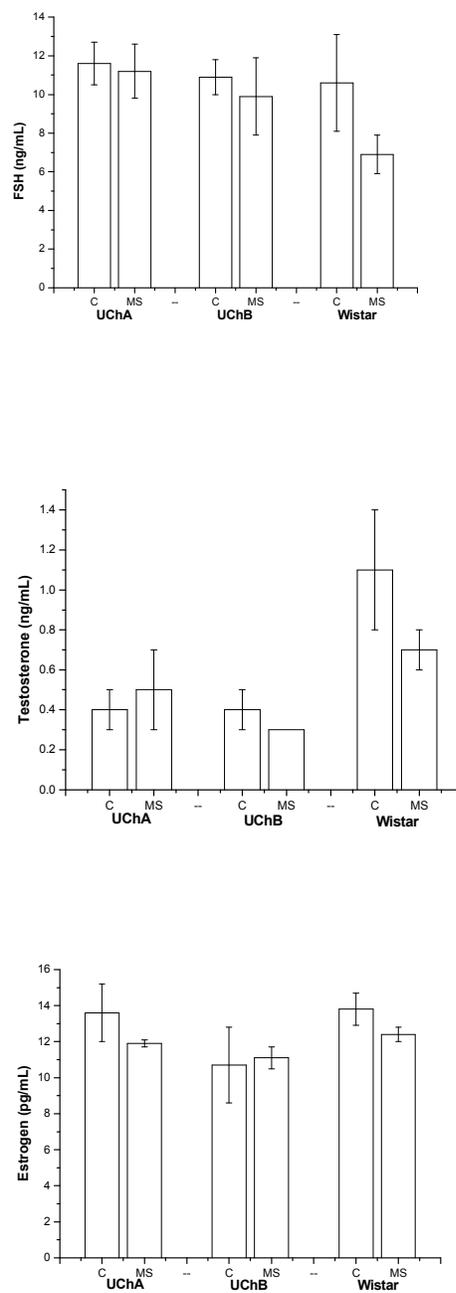
Figura 2



Teor plasmático de LH (ng/mL) nas linhagens UChA, UChB e Wistar (média±erro padrão).

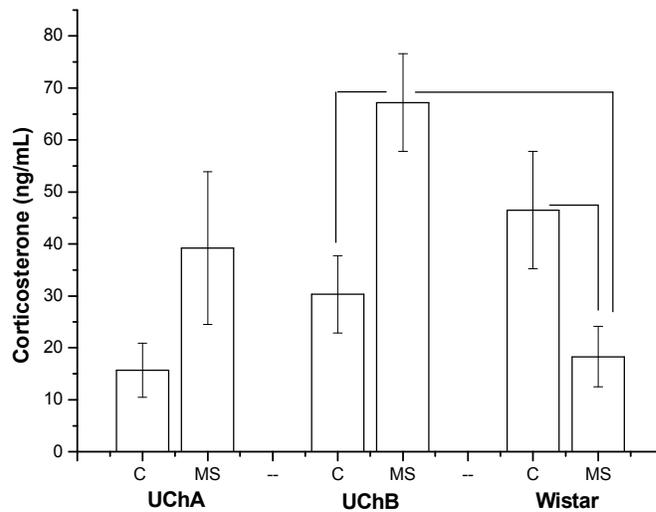
C=controle; MS= separação materna. As linhas indicam as diferenças significativas a 5%.

Figura 3



Teor plasmático de E (pg/mL), FSH (ng/mL) e T (ng/mL) nas linhagens UChA, UChB e Wistar (média±erro padrão). C=controle; MS=separação materna. As linhas indicam as diferenças significativas a 5%.

Figura 4



Teor plasmático de CORT (ng/mL) nas linhagens UChA, UChB e Wistar (média±erro padrão). C=controle; MS= separação materna. As linhas indicam as diferenças significativas a 5%.

V - CONCLUSÕES

Há interação entre a separação materna e a ingestão de etanol sobre o epidídimo, levando ao desequilíbrio nos eixos reguladores HHA e HHG observado através das alterações das concentrações plasmáticas de LH e CORT em ratos.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)