

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA E DO ALCOOLISMO NO TESTÍCULO DE
RATOS UChA E UChB (BEBEDORES VOLUNTÁRIOS DE ETANOL A 10%)

RAFAEL KREMER

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação 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 TESTÍCULO DE
RATOS UChA E UChB (BEBEDORES VOLUNTÁRIOS DE ETANOL A 10%)**

RAFAEL KREMER

PROF. DR. FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ
(Orientador)

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação 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

Kremer, Rafael.

Efeitos da separação materna e do alcoolismo no testículo de ratos UCHA e UChB (bebedores voluntários de etanol a 10 %) / Rafael Kremer. – Botucatu: [s.n.], 2007.

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

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Assunto CAPES: 20100000

1. Reprodução - Biologia 2. Aparelho genital masculino - Efeito das drogas
CDD 616.692

Palavras-chave: Estresse; Etanol; Separação Materna; Testículo; UCh

Dedico esta obra:

Aos meus pais, João Batista e Rosane, mestres sem diploma, cuja sabedoria temo não alcançar;

Ao meu irmão, Felipe Kremer, pelo companheirismo, incentivo, compreensão e auxílio durante os meus projetos de vida;

Ao meu grande amigo, Wilson de Mello Júnior, de quem recebi orientação, amizade, respeito e compromisso, características tão marcantes de sua personalidade; e

À minha esposa Patrine, pelo amor, respeito e carinho, em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez, pela oportunidade, orientação, amizade e sugestões.

Ao Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior, por ser profissional exemplar e amigo; sem seu apóio e estímulo este estudo seria impossível.

À Profa. Dra. Patrícia F. F. Pinheiro e ao Prof. Dr. Sérgio Pereira, pela acolhedora amizade, orientação e participação no estudo.

Aos professores do Departamento de Anatomia, do Programa de Biologia Geral e Aplicada e Grupo de Pesquisa da Biologia da Reprodução, pela colaboração e orientação.

Aos amigos pós-graduandos Dr. Otávio A. Martins e Giovana R. Teixeira pelo respeito, profissionalismo, compreensão, união e companheirismo, durante todos os momentos.

As amigas, Dra. Neuranei S. Bonfiglio e Dra. Eliane Victoriano, pelo incentivo e apoio para realização da pós-graduação.

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

Aos meus colegas servidores públicos do IBB – UNESP que ajudaram tecnicamente a compreender as etapas durante o desenvolvimento do experimento.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, à Profa. Dra. Wilma Kempinas e ao Prof. Dr. Celso R. Franci pela colaboração no desenvolvimento do estudo.

“O verdadeiro escritor nem tudo põe no seu livro, o trabalho mais essencial se realiza na própria alma dos leitores.”

Antoine François Rondelet

SUMÁRIO

RESUMO	06
<i>ABSTRACT</i>	07
1 INTRODUÇÃO	08
1.1 Plasticidade do desenvolvimento	08
1.2 Estresse na infância	09
1.3 Modelos de experiências emocionais na infância de roedores	10
1.4 Manipulação Neonatal (<i>Early Handling</i>)	11
1.5 Separação Materna	12
1.6 Período hiporresponsivo ao estresse	12
1.7 Interação mãe-filhote e comportamento materno	13
1.8 Alcoolismo	15
1.9 Modelos experimentais do alcoolismo – UChA e UChB	16
1.10 Efeitos do etanol no aparelho reprodutor masculino	17
1.11 Objetivo	19
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
3 ARTIGO	34
4 CONCLUSÃO	71

RESUMO

O fenótipo do animal é determinado através de uma complexa inter-relação entre seu genótipo e eventos ambientais. Eventos ambientais ocorridos na infância podem fornecer sinais e estímulos que informam previamente as condições ambientais que se viverá na vida adulta, possibilitando ajustes no fenótipo para sobrevivência da espécie. Na infância, os cuidados maternos são a principal fonte de sinais e estímulos (térmicos, somatossensórios, nutricionais, olfatórios, visuais e auditivos) para o adequado desenvolvimento, crescimento e produção de respostas adaptativas a fatores estressantes. Porém, a privação da presença materna pode romper com essa proteção e ser fator estressante durante o início da vida. Experiências adversas na infância estão associadas à vulnerabilidade em desenvolver psicopatologias, ingestão abusiva de álcool e distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse, na vida adulta. Neste estudo foi avaliada a interferência da Separação Materna (SM), aplicada em filhotes machos de ratos bebedores voluntários de etanol, na estrutura e função das gônadas no adulto, estudando a interação entre os efeitos do alcoolismo adulto na reprodução e a SM ocorrida durante o período pós-natal. Ratos Wistar, UChA e UChB (bebedores de baixa e elevada quantidade de etanol a 10%) sofreram SM (240min) do 4º ao 14º dia de idade. Aos 65 dias de idade foi disponibilizada solução de etanol aos ratos UChA e UChB. Aos 120 dias, os animais foram sacrificados para avaliação da estrutura do epitélio germinativo e interstício testicular, determinação da produção diária de espermatozóides e mensuração do peso e volume testiculares. Complementando, foi realizada avaliação das concentrações plasmáticas de testosterona, FSH, LH e corticosterona desses animais. Ratos alcoólicos submetidos a SM apresentaram maiores concentrações plasmáticas de corticosterona. Morfologicamente, os animais SM apresentaram preservação do epitélio germinativo e diminuição das atrofia total e do interstício testiculares provocadas pela ingestão de etanol. Assim, confirmou-se a existência de interação entre os efeitos do alcoolismo adulto e Separação Materna na reprodução, presumindo-se que informações precoces, sobre condições adversas na vida adulta, podem atenuar os efeitos do etanol no testículo de ratos alcoólicos, garantindo a reprodução da espécie.

Palavras-chaves: Testículo; Reprodução; Separação Materna; Estresse; Etanol; Alcoolismo; Ratos UChA e UChB; Toxicologia reprodutiva.

ABSTRACT

The phenotype of the animal is determined through a complex interrelation between its genotype and ambient events. Occurred ambient events in childhood can supply to signals and stimulus that previously inform the ambient conditions that will be lived in the adult life, making possible adjustments in phenotype for survival of the species. In childhood, the maternal cares are the main source of signals and stimulus (thermal, somatosensory, nutritious, olfactory, visual and auditory) for the adjusted development, growth and production of adaptative answers to stressful factors. However, the privation of the maternal presence can breach with this protection and to be a stressful factor during the beginning of the life. Adverse experiences in childhood are associated to the vulnerability in developing psychopathologies, abusive alcohol ingestion and riots of the biological system of reply to stress, in the adult life. Therefore, in this study the interference of the Maternal Separation (MS) was evaluated, applied in male younglings of voluntary drinking rats of ethanol, in the structure and function of gonads in the adult, studying the interaction between the effects of adult alcoholism in occurred reproduction and MS during the after-birth period. Rats Wistar, UChA and UChB (drinking of low and raised amount of ethanol 10%) had suffered to MS (240 min) from 4° to 14° day of age. To the 65 days of age, a solution of ethanol to the rats UChA and UChB was bidden. To the 120 days, the animals had been sacrificed for evaluation of the structure of the germinated epithelium and interstice to testicular, determination of the daily sperm production and recognition of the weight and testicular volume. Complementing, it was carried through evaluation of the plasmatic concentration of testosterone, FSH, LH and cortichosterone of these animals. Alcoholic rats submitted to the MS had presented greater plasmatic concentrations of cortichosterone. Morphologically, the MS animals had presented preservation of the germinated epithelium and reduction of the total atrophies and the interstice testicular caused by the ingestion of ethanol. Thus, it confirmed the interaction existence between the effects of adult alcoholism and Maternal Separation in the reproduction, being presumed that precocious information, on adverse conditions in the adult life, can attenuate the effects of ethanol in the testicle of the alcoholic rats, guaranteeing the reproduction of the species.

Keywords: Testis; Reproduction; Maternal Separation; Stress; Ethanol; Alcoholism; UChA e UChB; Reproductive toxicology.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plasticidade do desenvolvimento

Diferentes pesquisas relacionadas ao desenvolvimento do comportamento, evolução ecológica, teorias de histórias de vida, biologia molecular e epidemiologia médica tem fornecido evidências de que um genótipo pode gerar diferentes fenótipos, dependendo das condições ambientais às quais o organismo é submetido (Batenson *et al.*, 2004). Dessa forma, o fenótipo de um animal é determinado através de uma complexa inter-relação entre seu genótipo e eventos ambientais (Macri & Wurbel, 2006; Fenóglia *et al.*, 2006). Eventos ambientais delineando o fenótipo ocorrem frequentemente durante a infância, e são capazes de modificar permanentemente respostas metabólicas de homens e animais (Bateson *et al.*, 2004; Fenóglia *et al.*, 2006; De Bellis *et al.*, 1999; Teicher, 2000; Pryce & Feldon, 2003; Gluckman, *et al.*, 2005). Essa plasticidade, ou seja, modificações no indivíduo durante o período do desenvolvimento, pode ocorrer em todos os níveis de organização, do comportamento até estruturas anatômicas, ainda que a possibilidade em modificar o desenvolvimento seja mais evidente no comportamento que em estruturas anatômicas (Macri & Wurbel, 2006).

Para Sih *et al.* (2004), a plasticidade durante o período do desenvolvimento apresenta-se dependente das variações ambientais. Em ambientes que variam imprevisivelmente ao longo do tempo, nenhuma predição sobre as condições ambientais futuras estará disponível ao desenvolvimento dos animais. Neste caso, a seleção natural tende a favorecer a evolução de limitada plasticidade (Sih *et al.*, 2004). Inversamente, em ambiente estáveis ou que variam previsivelmente, muitos organismos podem expressar respostas adaptativas específicas durante o período de desenvolvimento (Batenson *et al.*, 2004). Dessa forma, eventos ambientais podem fornecer sinais e estímulos que informam previamente as condições ambientais que se viverá na vida adulta, possibilitando ajustes no fenótipo para sobrevivência da espécie (Gluckman *et al.*, 2005; Houston & McNamara, 1992). Segundo Houston & McNamara (1992), um enorme esforço adaptativo é realizado para manter as funções reprodutivas, ainda que conseqüências danosas à saúde do animal possam ser observadas. Em circunstâncias adversas, por exemplo, pequena estatura e metabolismo lento podem facilitar a sobrevivência, entretanto, elevada estatura e metabolismo acelerado são vantajosos ao sucesso reprodutivo quando os recursos são mais abundantes (Bateson *et al.*, 2004). Ajustar o fenótipo de acordo com informações da infância pode ser altamente adaptativo e favorecido pela seleção natural (Sih *et al.*, 2004; Gluckman *et al.*, 2005; Macri & Wurbel, 2006).

1.2 Estresse na infância

O estresse é o 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. Após uma situação estressante, há liberação de glicocorticóides através da ativação do eixo HHA que constitui fator prejudicial à saúde do organismo e, em especial, para a função reprodutiva (Newport *et al.*, 2002).

Durante a infância, 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, sendo, por si só, fator estressante durante o início da vida (De Bellis *et al.*, 1999; Newport *et al.*, 2002; Gluckman *et al.*, 2005).

Sigmund Freud, criador da psicanálise, foi um dos primeiros a enfatizar a importância das experiências vividas na infância e seus profundos efeitos na idade adulta. Freud sustentava que experiências traumáticas podem resultar em comportamentos que se mantêm por muitos anos e contribuem para expressão de psicopatologias (Levine, 2000). Dessa forma, tem-se pesquisado conseqüências a longo prazo sobre funções nervosas e emocionais de traumas provocados na infância (Holmes *et al.*, 2005).

Traumas e negligências na infância exercem influências no comportamento emocional e riscos para o desenvolvimento de depressão, ansiedade e abuso de substâncias durante o crescimento (Dube *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Kendler *et al.*, 1995). Estudos específicos têm demonstrado alterações dos mecanismos neurais em crianças traumatizadas, podendo produzir anormalidades em regiões encefálicas que implicam em desordens emocionais. Pacientes deprimidos, com história de abuso infantil, demonstraram hiperreatividade do eixo HHA, o maior componente do sistema de resposta ao estresse (Heim & Nemeroff, 2001), e menor volume hipocampal (Bremner *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1997; Vythilingam *et al.*, 2002). Além disso, existem evidências preliminares que abusos na infância podem favorecer ou exacerbar anormalidades encontradas no córtex pré-frontal de pacientes com desordens de ansiedade (Carrion *et al.*, 2001; De Bellis *et al.*, 2000; Mathew *et al.*, 2004). De fato, traumas na infância podem não somente aumentar o risco dessas desordens no adulto, mas iniciar doenças e alterar a eficácia do tratamento dessas condições (Friedman *et al.*, 2003; Gladstone *et al.*, 1999, 2004; Matza *et al.*, 2003; Mcholm *et al.*, 2003; Nemeroff *et al.*, 2003; Romans *et al.*, 1995; Roy, 2002; Zlotnick *et al.*, 1995).

Para melhor compreender as conseqüências do trauma infantil no comportamento emocional e na reatividade ao estresse durante a idade adulta, tem-se utilizado modelos experimentais principalmente com roedores.

1.3 Modelos de experiências emocionais na infância de roedores

Modelos animais, embora com limitações, são ferramentas importantes que oferecem certas vantagens em relação às pesquisas com seres humanos. Experimento com roedores têm-se mostrado modelo biológico adequado para testes de perfis de comportamento fisiológico e neuroendócrino, pois possuem período gestacional breve, podem ser criados em amplo número, facilitam o acompanhamento do desenvolvimento, permitem manipulações específicas e controladas do ambiente e medidas invasivas das atividades biológicas (Newport *et al.*, 2002).

Modelos experimentais com roedores demonstram que a exposição ao estresse durante o período pós-natal ou na fase juvenil após o desmame podem alterar permanentemente o sistema nervoso e os índices comportamentais de emotividade e dependência no rato adulto (Hall, 1998; Kofman, 2002). Segundo Newport *et al.* (2002), esses resultados são notavelmente similares aos observados nas doenças relacionadas ao estresse em seres humanos. Além disso, crianças que sofreram estresse durante a infância, devido a alterações no comportamento dos pais, demonstraram alterações permanentes do comportamento (Teicher, 2000).

Os primeiros trabalhos considerando possíveis efeitos permanentes do trauma pós-natal em roedores foram realizados por Levine e Weininger na década de 50. Desde então, são encontrados na literatura especializada pesquisas com diferentes modelos experimentais: manipulação neonatal, os filhotes são manuseados com estímulo tátil por períodos que variam de três segundos a dez minutos por dia (Fernández-Teruel *et al.*, 1991; González *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 1999; Riul *et al.*, 1999); separação materna de curta duração, os filhotes são afastados dos cuidados maternos por períodos de 15 a 20 minutos; e privação materna ou separação materna de longa duração, onde os períodos são superiores a 180 minutos (Meaney *et al.*, 1989, 1993; Ogawa *et al.*, 1994; Pham *et al.*, 1997; Levine, 2000). Há outros agentes estressores utilizados: isolamento, exposição ao calor, ao frio, à luz, ao ruído, ao éter e aplicação de choque (Levine & Lewis, 1959; Denelsky & Denenberg, 1967; González *et al.*, 1990; Eck & Kuhn, 1992; D'Amore *et al.*, 1993; Smythe *et al.*, 1994; Costela *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997). Entretanto, os procedimentos de Manipulação Neonatal e Separação

Materna, são os principais modelos experimentais que buscam entender a relação entre experiências na infância e suas conseqüências no adulto.

1.4 Manipulação Neonatal (*Early Handling*)

No início dos anos 50, Weininger (1954) demonstrou que estímulos táteis neonatais (de 10 minutos por dia durante as três primeiras semanas de vida) eram capazes de atenuar problemas futuros, psicológicos e comportamentais em ratos albinos adultos. Esses resultados causaram controvérsia quando Levine (1957) e Levine & Lewis (1959) demonstraram que a simples separação da mãe, realizada diariamente por três minutos, produzia efeitos similares nas ninhadas. Os resultados desse experimento deram origem ao paradigma da manipulação neonatal (*Early Handling*), que consiste, usualmente, na retirada dos filhotes da caixa onde está a mãe, passando-os, todos juntos, para outra caixa durante 15 a 20 minutos, sendo que após esse período a ninhada retorna para a caixa materna. Esse procedimento é realizado, no geral, nos primeiros 21 dias de vida e os animais são testados na maturidade. O modelo experimental foi inicialmente utilizado para investigar como variações ambientais estressantes que acontecem nas fases iniciais da vida, podem alterar o desenvolvimento de sistemas neuroquímicos específicos, provocando alterações permanentes da resposta biológica ao estresse (Meaney *et al.*, 1993; LEVINE, 2000).

Entretanto, a Manipulação Neonatal é um modelo que atenua os efeitos nocivos e severos do estresse na idade adulta. No experimento de Levine (1957), ratos submetidos à Manipulação Neonatal, após exposição a um agente estressor no adulto, apresentaram redução no peso das glândulas adrenais comparados aos ratos não manipulados. Ratos submetidos à Manipulação Neonatal, quando expostos a estímulos aversivos na fase adulta, apresentaram diminuição dos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e da corticosterona plasmática. Além disso, há rápida recuperação das concentrações plasmáticas da corticosterona normais e redução do fator de liberação de corticotrofina (CRF) no hipotálamo (Meaney, 2001; Pryce & Feldon, 2003; Levine, 2000). Portanto, ratos expostos a Manipulação Neonatal exibem comportamento de ansiedade reduzido e respostas atenuadas do eixo HHA ao estresse, quando testados na vida adulta (Bhatnagar & Meaney, 1995; Denenberg *et al.*, 1962; Francis & Meaney, 1999; Levine, 1957; Meaney, 2001; Meaney *et al.*, 1989).

1.5 Separação Materna

Em contraste a diminuição da sensibilidade ao estresse, que tem sido observada depois de breves períodos de Manipulação Neonatal, prolongadas Separações Maternas aumentam a resposta à reatividade emocional na vida adulta de ratos. Na Separação Materna, geralmente, os filhotes são separados da mãe em intervalos de quatro horas, durante dias do desenvolvimento pós-natal. Segundo Zimmerberg *et al.* (2003), a Separação Materna se assemelha a negligência materna na infância de humanos, pois a ausência da mãe priva os filhotes de cuidados maternos essenciais (Meaney, 2001).

A Separação Materna neonatal tem causado hiper-reatividade duradoura do eixo HHA, exibindo aumento persistente do comportamento de ansiedade e das concentrações plasmáticas de corticosterona e ACTH, em animais submetidos ao estresse na idade adulta (Huot *et al.*, 2002; Ladd *et al.*, 2000; Plotsky & Meaney, 1993; Pryce *et al.*, 2001; Biagini *et al.*, 1998). Tal manifestação tem sido atribuída à diminuição da eficiência da retroalimentação negativa da corticosterona no hipotálamo, pois receptores de corticosterona encontram-se diminuídos no hipotálamo desses animais (Biagini *et al.*, 1998).

Embora menos estudado que o comportamento emotivo e a reatividade ao estresse, o estresse na infância de ratos pode interferir no desenvolvimento da parte do sistema nervoso mediadora do comportamento de recompensa. Existem evidências que a Separação Materna aumenta o consumo voluntário de etanol (Huot *et al.*, 2001; Ploj *et al.*, 2003; Roman *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2002), exagera o comportamento e a resposta dopaminérgica para psicoestimulantes, e altera a sinalização de dopamina e opióides em regiões de recompensa, como córtex frontal e núcleo *acumbens* (Matthews *et al.*, 1996, 1999, 2001; Meaney *et al.*, 2002; Ploj & Nylander, 2003; Ploj *et al.*, 2003; Rots *et al.*, 1996).

1.6 Período hiporresponsivo ao estresse

Na infância de ratos, durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, os níveis basais do CRF, do ACTH e da concentração plasmática de corticosterona são particularmente baixos, pois o eixo HHA está normalmente quiescente. Nesse período, denominado de Período Hiporresponsivo ao Estresse (*SHRP*, do inglês *stress hiporesponsive period*), 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; Schmidt *et al.*, 2003). Mesmo a administração de doses elevadas de ACTH exógeno tem mostrado ineficiência em elevar as concentrações de corticosterona. A baixa responsividade do eixo HHA, nesse período, tem sido atribuída ao

aumento da eficácia da retroalimentação negativa exercida pela corticosterona, principalmente sobre o hipotálamo (Levine, 1994, 2001).

O SHRP é crítico para o desenvolvimento neural, em que processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular prevalecem no cérebro, além de que sistemas inibitórios e excitatórios de neurotransmissão alcançam a maturidade (González *et al.*, 1994). Portanto, o SHRP permite o desenvolvimento do sistema nervoso central na ausência do aumento de secreção de glicocorticóides que poderia acarretar diminuição das mitoses, da mielinização, da neuromorfogênese e do tamanho cerebral, prejudicando permanentemente as funções neuroendócrinas (Levine, 1994, 2001) e a reprodução (Biagini & Pich, 2002)

1.7 Interação mãe-filhote e comportamento materno

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 térmicos, somatossensórios, olfatórios, visuais e auditivos que são essenciais no desenvolvimento pós-natal. O ambiente proporcionado pela mãe no período pós-natal produz impactos psicológicos e neurobiológicos em animais e seres humanos, influenciando respostas metabólicas durante toda a vida (De Bellis *et al.*, 1999; Teicher, 2000; Pryce & Feldon, 2003).

Cuidados maternos em roedores manifestam-se na forma de períodos intercalados de amamentação. Ocorrem através da atitude materna de aproximação e reunião dos filhotes debaixo de seu corpo, do ato de lambê-los com frequência e em assumir pronunciada arcada dorsal como postura de nutrição. Esse conjunto de cuidados maternos tem sido descrito na literatura pela sigla LG-ABN (*Licking and grooming & arched-back nursing*) (Stern & Johnson, 1990). A distribuição temporal desses períodos de amamentação (sua frequência e duração) e possivelmente alguns aspectos qualitativos (postura materna) parecem ser mediados pela complexa inter-relação entre a sinalização dos filhotes e a motivação materna (Meaney, 2001; Pryce & Feldon, 2003; Stern & Johnson, 1990).

Durante o desenvolvimento ontogenético inicial, mãe e filhote podem ser considerados como unidade biológica, pois o comportamento materno tem capacidade de suprimir e servir como fonte reguladora da resposta do eixo HHA do filhote. De acordo com Levine (2000, 2001), o comportamento de lambe a prole no sentido anogenital exerce controle inibitório

sobre a secreção de ACTH e o aleitamento mantém as concentrações de corticosterona em valores reduzidos (Meaney, 1993; Levine, 2000).

Interessantemente, esses estudos têm mostrado que embora esse comportamento seja estabelecido no relacionamento com a ninhada, existem pronunciadas diferenças individuais entre as diferentes linhagens de ratos (Holmes *et al.*, 2005). Essas diferenças individuais no estilo materno de cuidados com o filhote aparecem como preditivo de futuros comportamentos emocionais e respostas ao estresse nas ninhadas. Mães mostrando baixos níveis de LG-ABN tendem a produzir ninhadas que exibem comportamento ansioso e respostas exageradas de estresse, contrariamente às mães com comportamento LG-ABN elevado (Caldji *et al.*, 1998, 2000).

Em 1980, realizando experimentos de Manipulação Neonatal, Smotherman e Bell (Levine, 2000) levantaram a hipótese da mediação materna para explicar como um procedimento aparentemente inócuo de separação de filhotes, por breve período do desenvolvimento em ratos, poderia ter conseqüências persistentes sobre o comportamento do eixo HHA. Investigando a interação mãe-filhote, verificou-se que a Manipulação Neonatal ativa os cuidados maternos (LG-ABN) e diminui as respostas ao medo e a ansiedade futuras dos filhotes; enquanto as mães de filhotes não manipulados apresentaram posturas mais passivas de amamentação (Francis & Meaney, 1999; Meaney, 2001).

Ninhadas criadas por mães exibindo elevados níveis de cuidados maternos mostraram reduções plasmáticas de ACTH e corticosterona em resposta a estressores em adultos comparados aos de mães com baixo cuidado materno. Esses efeitos foram associados com a redução de CRF no hipotálamo, indicando diminuição da resposta ao estresse e ao aumento da expressão de receptores de glicocorticóides (GR) no hipotálamo, sugerindo uma elevada retroalimentação negativa no sistema (Meaney, 2001). Além disso, ninhadas de mãe com elevado cuidado materno mostraram redução de resposta emocional em testes de ansiedade e medo (Caldji *et al.*, 1998).

Inversamente, a Separação Materna modifica o comportamento materno diminuindo cuidados e aumentando a resposta de medo e do eixo HHA das mães (Champagne *et al.*, 2001). Meaney (2001) relata que mudanças ambientais (evocação de medo e estresse) podem reduzir os níveis de cuidado materno. Acrescenta que baixos níveis de cuidado materno podem ser interpretados pelos filhotes como sinal de adversidade do ambiente, dessa forma, há ajuste adaptativo, aumentando a resposta do sistema neuroendócrino em situações de estresse e medo. Todavia, tendo em vista as variações de cuidado materno na relação com manipulações

ambientais, há evidência comprovando a hipótese que mudanças no desenvolvimento do HHA e respostas de medo são mediadas por cuidados maternos.

A transmissão desses efeitos não tem sido relacionada a diferenças genéticas no comportamento emocional, pois filhotes nascidos de mães com elevados níveis LG-ABN adotados por mães com baixo LG-ABN produziram alta reatividade ao estresse da ninhada e vice e versa (Francis *et al.*, 1999). E mães providas de ninhadas adotivas, durante o período de Separação Materna de seus próprios filhotes, não apresentam alterações comportamentais e suas próprias ninhadas não exibiram hiper-emocionalidade subsequente (Huot *et al.*, 2004).

1.8 Alcoolismo

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 (Neto, 2003).

Freqüentemente pessoas portadoras de outras doenças mentais (ansiedade, pânico, fobias, depressão) apresentam também problemas relacionados ao uso de álcool (Neto, 2003). Room *et al.* (2005) relatam que o uso indiscriminado do álcool está ligado a mais de 60 diferentes doenças, que incluem problemas coronários, cirrose e câncer. 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; Novelli, *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 1993, 1997, 2000, 2002; Cagnon *et al.*, 2001). Portanto, devido as complicações sobrevindas no plano somático e psíquico, e pela profunda repercussão no meio social, o alcoolismo figura como um dos mais graves problemas de saúde pública do Brasil (Fortes & Cardo, 1991).

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: (1^a) o sistema da enzima álcool desidrogenase (ADH) na matriz citoplasmática, (2^a) o sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) no retículo endoplasmático liso e o da (3^a) 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 sanguínea, 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 (Lieber, 1993).

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, 1991), também conhecida como esteatose hepática.

1.9 Modelos experimentais de alcoolismo – UChA e UChB

Desde a década de 50, pesquisadores têm investigado roedores com preferências ao consumo de álcool. 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 quantidades elevadas e baixas de solução de álcool (Spanagel, 2000). Nesse contexto, as variedades de ratos UChA (bebedores de quantidades baixas de solução de etanol) e UChB (bebedores de quantidades elevadas de solução de etanol) foram desenvolvidas e são criadas.

As linhagens de ratos UChA e UChB têm sido adotadas em diferentes pesquisas relacionadas ao alcoolismo devido as suas características de consumo voluntário de etanol. Esse fenótipo, selecionado a partir da linhagem Wistar durante décadas, apresenta perfis de

consumo bem estabelecidos pelo trabalho pioneiro de Mardones na Universidade do Chile, de onde originou o nome UCh (Mardones & Segovia-Riquelme, 1983). Sendo que para linhagem UChB, deve-se apresentar consumo voluntário de elevada quantidade de etanol (4-7 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia) e os ratos da linhagem UChA consumo diminuído de etanol (0,1-2 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia) (Quintanilla & Tampier, 2003).

Tem-se observado que a diferença entre a ingestão de etanol nas linhagens UChB e UChA (respectivamente efeitos reforçadores e de aversão), deve-se principalmente a diferença na capacidade de metabolização do acetaldeído pela enzima aldeído-2 desidrogenase mitocondrial (ALDH2) no sistema nervoso central. Sendo que a atividade gênica para produção da ALDH-2 tem sido encontrada elevada em ratos UChB e diminuída em ratos UChA, justificando seus distintos consumos de etanol (Quintanilla & Tampier, 1995, 2002; Sapag *et al.*, 2003).

As variedades de ratos UChA (bebedores de quantidades baixas de etanol) e UChB (bebedores de quantidades elevadas de etanol) constituem modelos raros para estudos relacionados aos aspectos bioquímicos, fisiológicos, nutricionais, farmacológicos, ambientais e genéticos, dos efeitos do álcool (Mardones, 1993; Martinez *et al.*, 2000).

1.10 Efeitos do etanol no aparelho reprodutor 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; Martinez *et al.*, 1993, 2002). Além disso, o alcoolismo crônico tem sido associado com a impotência, diminuição da libido, ejaculação prematura, esterelidade e ginecomastia (Boyden & Pamerter, 1983).

Segundo Klassen & Persaud (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 concentração de testosterona também está associado à diminuição da produção desse pelas células de Leydig e ao aumento da quebra e remoção de testosterona da corrente sanguínea. (Emanuele & Emanuele, 1998; Lloyd & Williams, 1948). Redução na produção, secreção e

atividade dos níveis dos hormônios hipofisários de LH e FSH, revelam a influência dos efeitos dos produtos do metabolismo do álcool no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Adler, 1992; Emanuele & Emanuele, 1998; Tadic *et al.*, 2000; Klassen & Persaud, 1978; Martinez, *et al.*, 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 aplicações intra-peritoneais de acetaldeído foram mais potente que o álcool na supressão na produção de testosterona (Badr *et al.*, 1977; Cobb *et al.*, 1978). Acredita-se que a enzima que medeia a quebra de álcool, a acetaldeído, use certas moléculas, isto é, co-fatores também requeridos por enzimas envolvidas na produção de testosterona (Ellingboe & Varanelli, 1979; Gordon *et al.*, 1980).

Anderson *et al.* (1987) observaram que a administração crônica de etanol em camundongos levou a diminuição no peso testicular, prejuízo na espermatogênese, redução na densidade da túnica albugínea, no diâmetro dos túbulos seminíferos, ao aumento na quantidade de células germinativas imaturas descamadas e de túbulos seminíferos inativos. Segundo Martinez *et al.* (2002), os vários estudos sobre as alterações morfológicas na próstata, vesícula seminal, glândula de coagulação, epidídimo e 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, justificando-se novas pesquisas.

1.11 Objetivo

Investigar se a Separação Materna, aplicada em filhotes machos de ratos bebedores voluntários de etanol, interfere na estrutura e função dos testículos no adulto; verificando se há interação entre a Separação Materna e os efeitos do alcoolismo adulto na reprodução.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, R.A. Clinically important effects of alcohol on endocrine function. *Journal of Clinical of Endocrinology and Metabolism*, v.74, p.957-60, 1992.

ANDERSON Jr, R.A.; WILLIS, B.R.; PHILLIPS J.F.; OSWALD, C.; ZANEVELD, L.J.D. Delay pubertal developmental of the male reproductive tract associated with chronic athanol ingestion. *Biochm.Pharmacol.*, v.36, p.2157-67, 1987.

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.305-10, 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.647-55, 1977.

BATESON, P.; BARKER, D.; CLUTTON-BROCK, T; DEB, D.; D'UDINE, B.; FOLEY,R.A.; GLUCKMAN, P. GODFREY, K.; KIRKWOOD, T.; LAHR, M.M.; MCNAMARA, J.; METCALFE, N.B.; MONAGHAN, P.; SPENCER, H.G.; SULTAN, S.E. Developmental plasticity and human health. *Nature*, v.430, p. 419-421, 2004.

BHATNAGAR, S., MEANEY, M.J. Hypothalamic–pituitary–adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J. Neuroendocrinol.*, v.7, p.97–108, 1995.

BIAGINI, G.; PICH, E.M.; CARANI, C.; MARRAMA, P.; AGNATI L.F. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v.16, p.187-97, 1998.

BIAGINI, G.; PICH, E.M. Corticosterone administration to rat pups, but not maternal separation, affects sexual maturation and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the testis. *Pharmacol Biochem Behav.*, v.73, p.95-103, 2002.

BOYDEN, T.W.; PAMENTER, R.W. Effects of ethanol on male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocr. Rev.*, v.4, p.389-95, 1983.

BREMNER, J.; RANDALL, P.; VERMETTEN, E.; STAIB, L.; BRONEN, R.; MAZURE, C.; CAPELLI, S.; MCCARTHY, G.; INNIS, R.; CHARNEY, D. Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse—a preliminary report. *Biol. Psychiatry*, v.41, p.23–32, 1997.

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, p.354-360, 2001.

CALDJI, C.; TANNENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J.. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v.95, p.5335–5340, 1998.

CALDJI, C., DIORIO, J., MEANEY, M.J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol. Psychiatry*, v.48, p.1164–1174, 2000.

CARRION, V.G.; WEEMS, C.F.; ELIEZ, S.; PATWARDHAN, A.; BROWN, W.; RAY, R.D.; REISS, A.L. Attenuation of frontal asymmetry in pediatric posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry.*, v.50, p.943–951, 2001.

CHAMPAGNE, F.; DIORIO, J.; SHARMA, S.; MEANEY, M.J. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.12736-12741, 2001.

CLAIR, H.R.St. Recognizing alcoholism and its effects: a mine-guide. Basel: S. Karger, 1991, 105p.

COBB, C.F.; ENNIS, M.F.; van THIEL, D.H.; GAVALER, J.S.; LESTER, R. Acetaldehyde and ethanol are direct testicular toxins. *Surgical Forum*, v.29, 87-102, 1978.

COSTELA, C.; TEJEDOR-REAL, P.; MICO, J.A.; GIBERT-RAHOLA, J. Effect of neonatal handling on learned helplessness model of depression. *Physiol. Bahav.*, v.57, p.407-410, 1995.

D'AMORE, A.; MARANO, G.; LOIZZO, A. Reduced antinoceptive response to beta-endorphin in adult mice after chronic neonatal handling. *Physiol. Bahav.*, v.53, p.1025-1027, 1993.

DE BELLIS, M.D.; KESHAVAN, M.S.; SPENCER, S.; HALL, J. N-Acetylaspartate concentration in the anterior cingulate of maltreated children and adolescents with PTSD. *Am. J. Psychiatry*, v.157, p.1175–1177, 2000.

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. *Biology Psychiatry*, v.45, p.1235-6, 1999.

DENELSKY, G.V.; DENENBERG, V.H. Infantile stimulation and adult exploratory behavioral in the rat: effects of handling upon visual variation seeking. *Anim. Bahav.*, v. 15, p.568-573, 1967.

DENENBERG, V.H., OTTINGER, D.R., STEPHENS, M.W. Effects of maternal factors upon growth and behavior of the rat. *Child Dev.*, v.33, p.65–71, 1962.

DUBE,R.S.; ANDA, R.F.; FELITTI, V.J.; CHAPMAN, D.P.; WILLIAMSON, D.P.; GILES, W.H. Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. *JAMA*, v.286, p.3089–3096, 2001.

ECK, J.B.; KUHN, C.M. Effect of ether stress on growth hormone during development in the neonatal rat. *Neuroendocrinology*, v.56, p.605-610, 1992;

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, & Behavior*, v.4(1), p.20-30, 2005.

ELLINGBOE, M.A. & VARANELLI, C.C. Ethanol inhibits testosterone biosynthesis by direct action on Leydig cells. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, v.24, p.87-102, 1979.

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

FENOGLIO, K.A.; BRUNSON, K.L.; BARAM, T.Z. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: Functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.27, p.180-92, 2006.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R.M.; DRISCOLL, P.; TOBEÑA, A.; BÄTTIG, K. Infantile (handling) stimulation and bahavioral in yuong roman high – and – low avoidance rats. *Physiol. Behav.*, v.50, p.563-565, 1991.

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

FRANCIS, D.D., MEANEY, M.J. Maternal care and the development of stress responses. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.9, p.128–134, 1999.

FRIEDMAN, S.; SMITH, L.; FOGEL, D.; PARADIS, C.; VISWANATHAN, R.; ACKERMAN, R.; TRAPPLER, B. The incidence and influence of early traumatic life events in patients with panic disorder: a comparison with other psychiatric outpatients. *J. Anxiety Disord.*, v.16, p.259–272, 2003.

GAYOTTO, L.C.C.; ALVES V.A.F. Doenças do fígado e vias biliares. São Paulo: Atheneu, 2001. v. 2. p. 674-80.

GLADSTONE, G.; PARKER, G.; WILHELM, K.; MITCHELL, P.; AUSTIN, M.-P. Characteristics of depressed patients who report childhood sexual abuse. *Am. J. Psychiatry*, v.156, p.431–437, 1999.

GLADSTONE, G.; PARKER, G.; WILHELM, K.; MALHI, G.S.; MITCHELL, P.; AUSTIN, M.-P. Implications of childhood trauma for depressed women: an analysis of pathways from childhood sexual abuse to deliberate self-harm and revictimization. *Am. J. Psychiatry*, v.161, p.1417–1425, 2004.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; SPENCER, H.G.; BATESON, P. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc. Biol. Sci.*, v.272, p.671-677, 2005.

GOMES, C.M; FRANTZ, P.J.; SANVITTO, G.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; LUCION, A.B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.1239-1242, 1999.

GONZÁLEZ, A.S et al. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. II. Effects on estrous cycles in females. *Physiol. Behav.*, v.56, p.591-595, 1994.

GONZÁLEZ A.S.; RODRÍGUEZ-ECHANDÍA E.L.; CABRERA R.; FÓSCOLO M.R.; FRACCHIA, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiol. Behav.*, v.47, p.735-741, 1990.

GORDON, G.S.; SOUTHREN, A.L.; VITTEK, J.; MUNNANGI, P.; LIEBER, C.S. Effect of chronic ethanol ingestion on the biosynthesis of steroids in rat testicular homogenate in vitro. *Endocrinology*, v.106, p.1880-5, 1980.

HALL, F.S., 1998. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit. Rev. Neurobiol.*, v.12, p.129–162, 1998.

HEIM, C., NEMEROFF, C.B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatry*, v.49, p.1023–1039, 2001.

HOLMES, A.; GUIQUET, A-M L.E.; VOGEL, E.; MILLSTEIN, R.A.; LEMAN, S.; BELZUNG, C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2005;29:1335-46.

HOUSTON, A.I.; MCNAMARA J.M. Phenotypic plasticity as a state-dependent life-history decision. *Evolutionary Ecology* 1992;6:243-53.

HUOT, R.L.; THRIVIKRAMAN, K.; MEANEY, M.J.; PLOTSKY, P.M. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl.)*, v.158, p.366–373, 2001.

HUOT, R.L., GONZALEZ, M.E.; LADD, C.O., THRIVIKRAMAN, K.V.; PLOTSKY, P.M. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*, v.29, p.279–289, 2004.

HUOT, R.L.; PLOTSKY, P.M.; LENOX, R.H.; MCNAMARA, R.K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.*, v.950, p.52–63, 2002.

JOHNSON, J.G.; COHEN, P.; GOULD, M.S.; KASEN, S.; BROWN, J.; BROOK, J.S. Childhood adversities, interpersonal difficulties, and risk for suicide attempts during late adolescence and early adulthood. *Arch. Gen. Psychiatry*, v.59, p.741–749, 2002.

KENDLER, K.S.; KESSLER, R.C.; WALTERS, E.E.; MACLEAN, C.; NEALE, M.C.; A.C.; EAVES, L.J. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am. J. Psychiatry*, v.152, p.833–842, 1995.

KLASSEN, R.W.; PERSAUD, T.V.N. Influence of alcohol on the reproductive system of the male rat. *Int. J. Fertil.*, v.23 (3), p.176-84, 1978.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.26, p.457–470, 2002.

LADD, C.O.; HUOT, R.L.; THRIVIKRAMAN, K.V.; NEMEROFF, C.B.; MEANEY, M.J.; PLOTSKY, P.M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog. Brain Res.*, v.122, p.81–103, 2000.

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*, v.126, p.405, 1957.

LEVINE, S. Influence of psychological variables on the activity of the Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Pharmacol.*, v.405, p.149-160, 2000.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.*, v.73, p.255-260, 2001.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.746, p.275–288, 1994.

LEVINE, S.; LEWIS, G.W. Critical period for effects of infantile experience on maturation of stress response. *Science*, v.129, p.42-43, 1959.

LIEBER, C.S. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Sem. Liver Dis.*, v.13, p.136-53, 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. *Annals of the American Journal of Medicine*, v.43, p.315-30, 1948.

MACRÌ, S.; WÜRBEL, H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior*, v.50, p. 667-80, 2006.

MCNAMARA, J.M.; HOUSTON, A.I. State-dependent life histories. *Nature*. v. 380, p.215-21, 1996.

MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELME, N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol Teratol*. v.5, p.171-8, 1983.

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. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *The Prostate*, v.22, p.317-24, 1993.

MARTINEZ, F.E.; GARCIA, P.J.; PADOVANI, C.R.; 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.537-42, 1997.

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.175-84, 2000.

MARTINEZ, F.E.; MARTINEZ, M.; QUITETE, V.H.A.C; MELLO JR.W.; PADOVANI, C.R. Alcoholismo, Reprodução e Genética. *Veterinária Notícias*, v.8 (2), p.121-30, 2002.

MATHEW, S.J.; MAO, X.; COPLAN, J.D.; SMITH, E.L.P.; SACKEIM, H.A.; GORMAN, J.M.; SHUNGU, D.C. Dorsolateral prefrontal cortical pathology in generalized anxiety disorder: a proton magnetic resonance spectro-scopic imaging study. *Am. J. Psychiatry*, v.161, p.1119–1121, 2004.

MATTHEWS, K.; DALLEY, J.W.; MATTHEWS, C.; TSAI, T.H.; ROBBINS, T.W. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse*, v.40, p.1–10. 2001.

MATTHEWS, K.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J.; CAINE, S.B. Repeated neonatal maternal separation alters intravenous cocaine self-administration in adult rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, v.141, p.123–134, 1999.

MATTHEWS, K.; HALL, F.S.; WILKINSON, L.S.; ROBBINS, T.W. Retarded acquisition and reduced expression of conditioned locomotor activity in adult rats following repeated early maternal separation: effects of prefeeding, D-amphetamine, dopamine antagonists and clonidine. *Psychopharmacology (Berl.)*, v.126, p.75–84, 1996.

MATZA, L.S.; REVICKI, D.A.; DAVIDSON, J.R.; STEWART, J.W. Depression with atypical features in the National Comorbidity Survey: classification, description and consequences. *Arch. Gen. Psychiatry*, v.60, p.817–826, 2003.

MCHOLM, A.E.; MACMILLAN, H.L.; JAMIESON, E. The relationship between childhood physical abuse and suicidality among depressed women: results from a community sample. *Am. J. Psychiatry*, v.160, p.933–938, 2003.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; BODNOFF, S.R.; INY, L.J.; TATAREWICZ, J.E.; SAPOLSKY, R.M. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav. Neurosci.*, v.99, p.765–770, 1993.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; VIAU, V.; SHARMA, S.; SARRIEAU, A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*, v.50, p.597–604, 1989.

MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci.*, v.24, p.1161–1192, 2001.

MEANEY, M.J., BRAKE, W., GRATTON, A. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*, v.27, p.127–138, 2002.

NEMEROFF, C.B.; HEIM, C.M.; THASE, M.E.; KLEIN, D.N.; RUSH, A.J.; SCHATZBERG, A.F.; NINAN, P.T.; MCCULLOUGH, J.P.; WEISS, P.M.; DUNNER, D.L.; ROTHBAUM, B.O.; KORNSTEIN, S.; KEITNER, G.; KELLER, M.B. Differential responses to psychotherapy versus pharmacotherapy in patients with chronic forms of major depression and childhood trauma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v.100, p.14293–14296, 2003.

NETO, M.R.L. Saúde Mental. São Paulo. *Psiquiatria e Psicanálise on line*, 2003. Apresenta textos sobre saúde mental. Disponível em: <http://www.mentalhealth.med.br>. Acesso em: 10 dez. 2003.

NEWPORT D.J., STOWE Z.N.; NEMEROFF, C.B. Parental depression: animal models of an adverse live event. *Am. J. Psychiatry*, v.159, p.1265-83, 2002.

NOVELLI, E.L.B.; RODRIGUES, N.R.; SANTOS, C.X.C.; MARTINEZ F.E.; NOVELLI J.L.V.B.; NOVELLI, J.L. Toxic Effects of Alcohol Intake on Prostate of Rats. *The Prostate*, v. 31 (1), p.37-41, 1997.

OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; MORI, K.M.; TAKAHASHI, K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 49, p.961–967, 1994.

PALMER, T.N. The biochemistry of alcohol and alcohol abuse. *Sci. Prog.*, v.73, p.1-15, 1989.

PHAM T.M.; SÖDERSTRÖM, S.; HENRIKSSON, B.G.; MOHAMMED, A.H. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behav. Brain Res.*, v.86, p.113–120, 1997.

PLOJ, K.; NYLANDER, I. Long-term effects on brain opioid and opioid receptor like-1 receptors after short periods of maternal separation in rats. *Neurosci. Lett.* v.345, p.195–197, 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.787-99, 2003.

PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v.18, p.195–200, 1993.

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

PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D.; BAHR, N.I.; FELDON, J. Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. *Behav. Neurosci.*, v.115, p.71–83, 2001.

QUINTANILLA, M.E.; TAMPIER, L. Acetaldehyde-reinforcing effects: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol*, v.31, p.63–9, 2003.

QUINTANILLA, M. E.; CALLEJAS, O.; TAMPIER, L. Aversion to acetaldehyde: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol*, v.26, p.69–74, 2002

QUINTANILLA, M. E.; TAMPIER, L. Acetaldehyde metabolism by brain mitochondria from UChA and UChB rats. *Alcohol*, v.12, p.519–524, 1995.

RIUL, T.R.; CARVALHO, A.F.; ALMEIDA, P.S.; DE-OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, S.S. Ethological analysis of mother-pup interaction and other behavioral reactions in rat: effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.32, p.975-983, 1999.

ROMAN, E.; PLOJ, K.; NYLANDER, I. Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol*, v.33, p.31-9, 2004.

ROMANS, S.E.; MARTIN, J.L.; ANDERSON, J.C.; O'SHEA, M.L.; MULLEN, P.E. Factors that mediate between child sexual abuse and adult psychological outcome. *Psychol. Med.*, v.25, p.127–142, 1995.

ROOM, R.; BABOR, T.; REHM, J. In: *Alcohol and public health. The Lancet*. Disponível em: www.thelancet.com. Acesso em: 13 fev. 2005.

ROTS, N.; DE JONG, J.; WORKEL, J.; LEVINE, S.; COOLS, A.R. DE KLOET, E.R. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J. Neuroendocrinol.*, v.8, p.501–506, 1996.

ROY, A. Childhood trauma and neuroticism as an adult: possible implication for the development of the common psychiatric disorders and suicidal behaviour. *Psychol. Med.*, v.32, p.1471–1474, 2002.

SAPAG, A., TAMPIER, L., VALLE-PRIETO, A., QUINTANILLA, M. E., MONCADA, C., ISRAEL, Y. Mutations in mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) change cofactor affinity and segregate with voluntary alcohol consumption in rats. *Pharmacogenetics*, v.13, p.509–515, 2003.

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. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v.21, p.125-32, 2003.

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. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, v.28(12), p.1814-1821, 2004.

SIH, A.; BELL A.; JOHNSON, J.C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview *Trends in Ecology & Evolution* 2004;19:372-8.

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.4622-8, 1997.

SMYTHE, J.W., ROWE, W.B., MEANEY, M.J. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, v.80, p.183–189, 1994.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health*, v.24 (2), p.124-31, 2000.

STEIN, M.B.; KOVEROLA, C.; HANNA, C.; TORCHIA, M.G.; McCLARTY, B. Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol. Med.*, v.27, p.951–959, 1997.

STERN, J.M., JOHNSON, S.K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats: I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol. Behav.*, v.47, p.993-1011, 1990.

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. Martin H. Teicher in *Cerebrum* – Dana Press, v. 2, p. 50-67, 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(1), p.117-129, 2005.

VÁZQUEZ, D.M.; ESKANDARI, R.; ZIMMER, C.A.; LEVINE, S.; LÓPEZ J.F. Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocrinology*, v.27, p.245–272, 2002.

VYTHILINGAM, M.; HEIM, C.; NEWPORT, J.; MILLER, A.H.; ANDERSON, E.; BRONEN, R.; BRUMMER, M.; STAIB, L.; VERMETTEN, E.; CHARNEY, D.S.; NEMEROFF, C.B.; BREMNER, D. Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am. J. Psychiatry*, v.159, p.2072–2080, 2002.

WEININGER, O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. *Science*, v.119, p.285-286, 1954.

ZIMMERBERG, B.; KIM, J.H.; DAVIDSON, A.N.; ROSENTHAL, A.J. Early deprivation alters the vocalization behavior of neonates directing maternal attention in a rat model of child neglect. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1008, p.308-313 2003.

ZLOTNICK C.,; RYAN, C.E.; MILLER, I.W.; KEITNER, G.I. Childhood abuse and recovery from major depression. *Child Abuse Negl.*, v.19, p.1513–1516, 1995.

3 ARTIGO

O presente estudo propiciou o desenvolvimento do artigo científico: “Separação Materna atenua efeitos deletérios do etanol no testículo de ratos UChA e UChB: Um mecanismo de plasticidade do desenvolvimento”.

O artigo científico encontra-se formatado de acordo com as normas da revista “Reproductive Toxicology” (ISSN 0890-6238), para o qual será submetido, após versão em inglês.

Separação Materna atenua efeitos deletérios do etanol no testículo de ratos UChA e UChB: Um mecanismo de plasticidade do desenvolvimento.

Separação Materna atenua efeitos deletérios do etanol no testículo de ratos UChA e UChB: Um mecanismo de plasticidade do desenvolvimento.

Resumo

Neste estudo foi avaliada a interferência da Separação Materna (SM), aplicada em filhotes machos de ratos bebedores voluntários de etanol, na estrutura e função das gônadas no adulto, estudando a interação entre os efeitos do alcoolismo adulto na reprodução e a SM ocorrida durante o período pós-natal. Ratos Wistar, UChA e UChB (bebedores de baixa e elevada quantidade de etanol a 10%) sofreram SM (240min) do 4º ao 14º dia de idade. Ratos alcoólicos submetidos a SM apresentaram maiores concentrações plasmáticas de corticosterona. Morfologicamente, os animais SM apresentaram preservação do epitélio germinativo e diminuição das atrofia total e do interstício testiculares provocadas pela ingestão de etanol. Assim, confirmou-se a existência de interação entre os efeitos do alcoolismo adulto e Separação Materna na reprodução, presumindo-se que informações precoces, sobre condições adversas na vida adulta, podem atenuar os efeitos do etanol no testículo de ratos alcoólicos, contribuindo para a reprodução da espécie.

Palavras-chaves: Testículo; Reprodução; Separação Materna; Estresse; Etanol; Alcoolismo; Ratos UChA e UChB; Toxicologia reprodutiva.

1. Introdução

O fenótipo de um animal é determinado através de uma complexa inter-relação entre seu genótipo e eventos ambientais [1,2]. Eventos ambientais delineando o fenótipo ocorrem frequentemente durante a infância, sendo capazes de modificar respostas metabólicas permanentes de homens e animais [2-7]. Essa plasticidade, durante o período de desenvolvimento, pode ocorrer em todos os níveis de organização, do comportamento até estruturas anatômicas, ainda que a possibilidade em modificar o desenvolvimento seja mais evidente no comportamento que em estruturas anatômicas [1]. Eventos ambientais podem fornecer sinais e estímulos que informam previamente as condições ambientais que se viverá na vida adulta, possibilitando ajustes no fenótipo para sobrevivência da espécie [1,7-10]. Em circunstâncias adversas, por exemplo, pequena estatura e metabolismo lento podem facilitar a sobrevivência, entretanto, elevada estatura e metabolismo acelerado são vantajosos ao sucesso reprodutivo quando os recursos são mais abundantes [3]. Ajustar o fenótipo de acordo com informações da infância pode ser altamente adaptativo e ser favorecido pela seleção natural. [1,7,9,10].

Sob esse aspecto, os cuidados maternos fornecem sinais e estímulos (têrmicos, somatossensórios, nutricionais, olfatórios, visuais e auditivos) para o adequado desenvolvimento e crescimento durante a infância, bem como contribuem para produzir respostas adaptativas a fatores estressantes. Porém, a privação da presença dos pais, especialmente materna, pode romper com essa proteção e ser fator estressante durante o início da vida [4,7,11-20]. Estudos clínicos e experimentais mostram que experiências adversas na infância, como abusos, negligências emocionais e morte dos pais, podem expressar seus efeitos através do desenvolvimento de psicopatologias [11,13,16,21-24], dependência de substâncias de abuso [25-29] e alterações no desenvolvimento e maturação das funções dos

órgãos na idade adulta [17,30-32]. Portanto, o desenvolvimento plástico pode, paradoxalmente, gerar genótipos mal-adaptados e favorecer o desenvolvimento de doenças [3,33].

Buscando compreender como essas influências ambientais na infância produzem conseqüências a longo prazo, têm sido realizados diferentes estudos sobre privações diárias dos cuidados maternos nas primeiras semanas de vida pós-natal de ratos. Como exemplo desses modelos experimentais, a Separação Materna (SM) consiste de interrupções diárias dos cuidados maternos por período prolongado (>1h). Ratos submetidos a SM têm manifestado na vida adulta aumento do comportamento de ansiedade e hiper-reatividade permanente do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em resposta a estímulos estressores [16,19,32,34-39]

O álcool, como estímulo estressor, é agente tóxico e perturbador da integridade das funções fisiológicas, bioquímicas e no desenvolvimento de estruturas orgânicas envolvidas na reprodução [40-43], bem como interfere na integridade dos eixos hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) e HHA [44-47]. Alterações nos diferentes níveis do eixo HHG podem manifestar-se no alcoólico crônico como: atrofia testicular, danos celulares ao epitélio germinativo e esterilidade [40, 47,49].

Dessa forma, foi investigado se a Separação Materna, aplicada em filhotes machos de ratos bebedores voluntários de etanol, interfere na estrutura e função dos testículos no adulto; verificando se há interação entre a Separação Materna e os efeitos do alcoolismo adulto na reprodução.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Os ratos das linhagens UChA (bebedores voluntários de baixa quantidade de etanol) e UChB (bebedores voluntários de alta quantidade de etanol) foram provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista (UNESP) e os ratos Wistar foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Foram formados doze casais de cada linhagem (UChA, UChB e Wistar). Cada linhagem formou dois grupos experimentais (Controle - Co e Separação Materna - SM), com seis ninhadas cada. No dia do nascimento, estipulado dia zero, a ninhada foi padronizada com oito filhotes, selecionando o maior número de machos possíveis. O número final de animais por tratamento foi quatorze e o período total de experimento foi de 120 dias. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e submetido à apreciação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do IBB/UNESP.

2.2. Indução de hiper-reatividade ao estresse por Separação Materna (SM)

Os filhotes das ninhadas dos grupos SM foram separados da mãe diariamente, durante o Período Hiporresponsivo ao Estresse (SHRP, do inglês *stress-hyporesponsive period*), do 4º ao 14º dia de idade, sempre no mesmo horário. Durante a SM, os filhotes foram individualizados em caixa com oito subdivisões, uma para cada filhote, durante 4h. Os filhotes foram acomodados em sala anexa, com temperatura de 30°C e a umidade superior a 50%. Posteriormente, foram devolvidos aos cuidados da mãe, com a retirada da mãe de sua

caixa antes de retornar a prole. Os filhotes dos grupos controle não foram separados da mãe, apenas receberam os cuidados padrão de manejo para criação de animais de laboratório.

Os animais foram manejados por único pesquisador do início ao fim da experimentação. As mãos do investigador foram lavadas em água corrente, secas e esfregadas na maravalha do forro das caixas da ninhada, eliminando os odores que pudessem levar a rejeição da mãe à prole. A sala de experimentação foi mantida isolada ao máximo de ruídos externos.

Os filhotes machos após o desmame, aos 21 dias, foram alojados em caixas com o mínimo de dois e o máximo de quatro animais, evitando o estresse pelo isolamento social. Aos 50 dias de idade foram individualizados e receberam manejo regular para a espécie.

2.3 Seleção dos animais bebedores de etanol

Aos 65 dias de idade, os ratos UChA e UChB receberam, além de água *ad libitum*, solução de etanol a 10%, durante um período de 15 dias, alternando as posições das garrafas (água e álcool) na caixa, durante as mensurações. Os animais da linhagem UChB que apresentaram maior consumo de etanol foram selecionados (n=14) e na linhagem UChA foram selecionados os animais com menor consumo de etanol (n=14). A administração de etanol a 10% para os ratos UChA e UChB, juntamente com provimento de água, ambos *ad libitum*, permaneceu até o final do experimento (120 dias).

O consumo de etanol foi mensurado em intervalos de quatro dias. A seleção e padronização das linhagens UChA e UChB foram realizadas segundo Mardones & Segovia-Riquelme [50].

Após a seleção dos animais bebedores de etanol, quatorze animais permaneceram para cada tratamento. Na linhagem Wistar também foi selecionado, ao acaso, o mesmo número de animais.

2.4. Coleta de materiais biológicos

Aos 120 dias de idade, os animais foram sacrificados e a coleta de materiais foi realizada de acordo com dois procedimentos distintos: a) sete animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para avaliação das concentrações hormonais plasmáticas do sangue. Em seguida, os testículos direitos foram coletados, pesados e fixados por congelamento a -20°C para avaliação da quantidade de espermátides e produção diária de espermatozóides. Os testículos esquerdos foram coletados, pesados e medidos os eixos transversal e longitudinal; b) após anestesia, sete animais foram submetidos à perfusão transventricular com solução fixadora de Bouin. Em seguida, os testículos direitos foram dissecados e submetidos à rotina histológica para análises morfométricas e da estrutura do epitélio e do espaço intersticial (estroma).

2.5. Dosagens hormonais

A coleta do sangue foi realizada entre 8 e 10 horas, após 12 horas de jejum. As concentrações plasmáticas de corticosterona, testosterona, FSH e LH foram dosados pelo método de rádioimunoensaio de duplo anticorpo, de acordo com o protocolo do fabricante (NEN Life Science Products, USA).

2.6. Avaliação da quantidade de espermátides e produção espermática diária

Para a contagem espermática, os testículos direitos dos animais decapitados foram coletados, pesados e congelados até a homogeneização. A túnica albugínea foi retirada e o parênquima testicular foi colocado em tubo de ensaio de 15ml e pesado. Acrescentaram-se 5ml de solução de 0,9% de NaCl, 0,05% de Triton X100 e 0,01% de Trimerosal (merthiolate). Colocou-se a material no homogeneizador Ultra-Turrax (marca Janke & Kunkel Ika-Werk) com pistilo de 10N por 50 segundos, passando em seguida pelo sonicador Thornton-Inspe

Eletrônica S/A na potência 6, com 80 mA por 30 segundos. Após a diluição de 10 vezes na mistura contendo TritonX100, uma pequena amostra foi transferida para duas câmaras de Neubauer (quatro campos por animal), procedendo à contagem das espermátides no estágio 19 (resistentes à homogeneização). O número de espermátides testiculares foi obtido pela média das contagens multiplicado pelos fatores de diluição. Na concentração espermática (número de espermátides por grama de testículo), a média do número de espermátides foi dividida pelo peso do parênquima testicular. O cálculo da produção diária de espermatozóides consistiu na divisão da quantidade espermática por 6,1: fator que corresponde ao número de dias que as espermátides maduras, estágio 19 da espermatogênese, estão presentes no epitélio germinativo [15].

2.7. Avaliação estrutural testicular e morfométrica dos túbulos seminíferos

Para análise da estrutura, o material fixado em Bouin foi lavado em álcool 70%, desidratado, diafanizado, incluído em paraplastico e cortado com quatro micrometros de espessura. Coleções de lâminas com cortes transversais foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TMa) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). A estrutura do epitélio seminífero e do interstício testicular (estroma) foram analisadas e fotografadas no microscópio ZEISS.

Para realização de mensurações foi utilizado o Sistema de Análise de Imagens Computadorizado - AxioVision. Duas lâminas histológicas por animal, coradas com HE, foram utilizadas nas análises morfométricas dos túbulos seminíferos. O diâmetros totais e da luz do túbulo seminífero, a altura e área do epitélio germinativo (área total diminuída da área da luz) e o número das células de Sertoli foram avaliados em 10 secções tubulares transversais por lâmina nos estágios VII e X (pré e pós-espermição) do ciclo do epitélio germinativo por animal.

2.8. Volumes total, do interstício e dos túbulos testiculares

O volume testicular (VT) foi determinado aplicando-se as medidas dos eixos transversal (ET) e longitudinal (EL) na fórmula: $VT = 4/3 \pi (EL/2) (ET/2)^2$, [52].

A distribuição percentual dos túbulos seminíferos (TS) e do tecido intersticial (TI) foi realizada pela contagem de pontos que incidiram nos túbulos seminíferos e tecido intersticial, segundo técnica de Weibel [53]. Para tanto, foi utilizada tabela com 168 pontos distribuídos em áreas geometricamente iguais. Foram mensurados 20 campos por testículo de cada animal, em ocular de 10X. A determinação dos volumes ocupados pelos túbulos seminíferos (VTS) e pelo tecido intersticial (VTI) foi realizada através das fórmulas: $VTS = VT \times \text{distribuição percentual de TS}/100$ e $VTI = VT \times \text{distribuição percentual de TI}/100$ [53].

2.9. 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. As conclusões estatísticas foram realizadas com 5% de significância [54].

3. Resultados

3.1. Ingestão de álcool

Os grupos Separação Materna e Controle (respectivamente, SM e Co), das linhagens bebedoras voluntárias de solução etanol a 10% (UChA e UChB) não apresentaram diferença significativa na avaliação da ingestão média diária de etanol, durante o período de tratamento (expressada em gramas por quilograma de peso corpóreo por dia), conforme mostrado na Tabela 1.

A ingestão diária de etanol, entre os grupos experimentais SM e Co de cada linhagem, foi similar em cada momento avaliado (Figura 1).

3.2. Mensurações corpóreas e testiculares

Os dados de volume total, massas relativa e absoluta dos testículos, assim como a massa corpórea do animal, são mostrados na tabela 2. A massa corpórea final apresentou variações significativas entre as linhagens. A menor massa corpórea foi apresentada pela linhagem UChB e a maior pela linhagem Wistar. Em relação aos grupos experimentais da linhagem UChB, a massa corpórea do grupo SM foi maior ao ser comparada com o Co. Nas demais linhagens, não houve diferença significativa entre SM e Co.

A exposição crônica de etanol alterou significativamente o volume (VT) e a massa (MT) testiculares, sendo menores nas linhagens bebedoras UChA e UChB e maiores na Wistar. Entretanto, VT e MT apresentaram-se maiores nos ratos submetidos à SM e ingestão de etanol, enquanto que na linhagem Wistar os valores de MT e VT não apresentaram diferenças significativas frente às condições experimentais. As massas relativas (massa do testículo/massa corpórea) foram menores no Co UChA e maiores no grupo SM Wistar.

3.3. Parâmetros da contagem espermática

O número de espermátides por testículo e a produção espermática diária (tabela 3) não apresentaram diferença significativa entre as linhagens e nas condições experimentais.

3.4. Morfometria e estrutura testiculares

Assim como o VT, o volume do interstício do testículo da linhagem UChB foi significativamente menor comparado com Wistar, enquanto valores intermediários foram apresentados pelos ratos UChA (tabela 4). Os grupos SM das linhagens submetidas à ingestão de etanol (UChA e UChB) apresentaram maior volume do interstício testicular comparados aos seus grupos Co. No interstício testicular das linhagens UChA e UChB foi observado, além de atrofia, redução da substância amorfa, aproximação das células de Leydig e capilares linfáticos (Figura 2).

Ao analisar os túbulos seminíferos das diferentes linhagens e tratamentos, durante os estágios pré e pós-espermição (respectivamente, VII e X) do epitélio seminífero, foram verificadas iguais mensurações morfométricas de área (área do túbulo menos a área da luz), diâmetro total e da luz, altura do epitélio e número de células de Sertoli. Diferentemente da preservação encontrada na morfometria e na estrutura do epitélio seminífero dos diferentes grupos, em 30% dos ratos controles da linhagem UChB foram visualizadas lesões nos túbulos seminíferos (Figura 2). Os túbulos seminíferos desses animais apresentaram epitélio totalmente desprovido de células da linhagem espermatogênica, sendo constituídos apenas por células de Sertoli. Notou-se ainda, a presença de espaços onde deveriam existir células germinativas e ausência de espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos (Figura 2). Esses animais foram excluídos da morfometria por incapacidade de identificação dos estágios.

3.5. *Análise hormonal*

As concentrações plasmáticas de FSH e testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (Tabela 5). A linhagem UChB ($0,36 \pm 0,04$ ng/ml) apresentou redução significativa da concentração de testosterona plasmática quando comparada com a linhagem Wistar ($0,88 \pm 0,20$ ng/ml). O LH foi significativamente maior no grupo SM da linhagem UChA. Entre as linhagens, o grupo SM UChA apresentou diferença significativa ao ser comparado com as demais linhagens (UChB e Wistar). Corticosterona foi maior no grupo SM que no Co na linhagem UChB e menor na linhagem Wistar. Os valores de corticosterona foram significativamente maiores na linhagem UChB, quando comparado com a Wistar.

4. Discussão

As linhagens de ratos UChA e UChB têm sido adotadas em investigações científicas relacionadas ao alcoolismo devido as suas características de consumo voluntário de etanol. Esse fenótipo, selecionado a partir da linhagem Wistar por décadas, apresenta perfis de baixo e alto consumo voluntário de etanol, bem estabelecidos pelo trabalho pioneiro de Mardones na Universidade do Chile, de onde originou o nome UCh [50]. A linhagem UChB apresenta consumo voluntário de elevada quantidade de etanol (4-7 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia) e a linhagem UChA consumo baixo de etanol (0,1-2 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia) [55]. Neste trabalho, o perfil de consumo de etanol foi mantido nos animais UChA e UChB, mesmo quando submetidos à Separação Materna. Esse resultado difere do observado em alguns estudos anteriores, onde eventos estressantes durante a infância de roedores, como a Separação Materna, favoreceram o consumo e a dependência ao etanol [21,23,26]. Acredita-se que as divergentes respostas da ingestão de etanol de ratos submetidos ao estresse na infância devem-se a diversidade de protocolos experimentais adotados e a utilização de linhagens diferentes [56].

Foi observado que a ingestão crônica de etanol diminui, proporcionalmente, a massa corpórea e o consumo de ração (dados não mostrados). Os ratos UChB apresentaram massa corpórea menor em relação aos ratos UChA, enquanto os ratos Wistar, os valores maiores. O etanol é um alimento altamente energético, porém pobre em nutrientes, seu consumo, substituindo alimentos necessários ao desenvolvimento orgânico, leva a perda de peso e a diminuição da disponibilidade de substâncias necessárias ao metabolismo [57,58]. Entretanto, apesar da perda de massa corpórea, não foram observados sinais de desnutrição (como queda de pêlos) em ambas as linhagens bebedoras de etanol.

A atrofia testicular observada está correlacionada com as diferenças de consumo de etanol entre as linhagens. Ratos UChB apresentaram valores de massa e volume testiculares similares aos descritos na literatura para ratos Wistar púberes submetidos à ingestão forçada de etanol [42]. Em ratos UChA, valores intermediários de massa e volume testiculares foram observados em relação aos ratos UChB e Wistar, demonstrando que a atrofia testicular é dose dependente. Em diferentes estudos, a atrofia testicular é característica patológica predominante no aparelho reprodutor de humanos e ratos alcoólicos, estando normalmente associada com a infertilidade, diminuição das concentrações plasmáticas de testosterona e LH [40,42,59,60]. A atrofia testicular pode ser consequência dos efeitos tóxicos do etanol nos diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônada [41,43,47,48,59,61,62]. Juntamente com a atrofia testicular, foi observado que o volume do interstício testicular dos ratos UChB foi menor ao ser comparado com o dos ratos Wistar, enquanto valores intermediários foram apresentados pelos ratos UChA. Além disso, o interstício testicular das linhagens UCh apresentou aproximação das células de Leydig e capilares linfáticos pela redução da substância amorfa (linfa). A concentração plasmática de testosterona também apresentou valores inferiores nos ratos que ingeriram etanol, expondo possíveis danos funcionais nas células de Leydig. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o etanol causa lesões na estrutura das células de Leydig, comprometendo sua função na esteroidogênese [43,63,64]. A produção e a secreção da testosterona são fundamentais para a espermatogênese e o trofismo testicular [43], o que justifica a atrofia testicular e a tendência à diminuição da produção diária de espermatozoides observada nas linhagens bebedoras de etanol.

Entretanto, ao se analisarem os túbulos seminíferos das diferentes linhagens e tratamentos, não foram verificadas alterações nas mensurações morfológicas da área, diâmetro total e da luz, altura do epitélio e número de células de Sertoli (exceto em 30% dos animais controles da linhagem UChB). Resultados similares foram descritos em ratos púberes

e adultos que foram expostos ao etanol e apresentaram atrofia testicular, infertilidade, diminuição da produção diária de espermatozóides e andrógenos, sem confirmar alterações morfológicas ou morfométricas no epitélio germinativo [40,42]. Em ratos alcoólicos, a integridade das junções intercelulares e do epitélio foi relatada juntamente com alterações endócrinas e na ultra-estrutura celular [43,65]. Salonen em 1989 [65] verificou que células germinativas são de alguma forma mais protegidas do que as células testiculares intersticiais, pois do interstício testicular para os túbulos seminíferos é verificada diminuição da concentração de etanol; justificando os resultados observados nas linhagens UChA e UChB. Isso pode explicar porque danos nas células de Leydig e alterações da secreção de testosterona são as principais alterações na exposição ao etanol. O consumo crônico de etanol tem sido visto em nosso estudo, afetando primeiramente o interstício do que os túbulos seminíferos e a rede testicular, o que explica porque distúrbios endocrinológicos normalmente precedem a efeitos na fertilidade. A diminuição da penetração do etanol na rede testicular e no interior dos túbulos seminíferos é atribuída à presença de junções especializadas do endotélio capilar, das células mióides e principalmente das células de Sertoli [65]. Esse complexo intitulado de barreira hemato-testicular tem sido visto gerando um microambiente propício ao desenvolvimento espermatogênico, através da diminuição da entrada de substâncias antibióticas, como elementos quimioterapêuticos, drogas de abuso e anticorpos [66-68].

Em nosso experimento, a Separação Materna na infância dos ratos que ingeriram etanol apresentou correlação com a concentração plasmática de corticosterona na vida adulta, sendo maiores em ratos submetidos à Separação Materna. Tem sido relatado [35,69,70] que ratos submetidos à Separação Materna durante as primeiras semanas de vida apresentam prolongado aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona a estímulos estressantes na vida adulta. Tal manifestação tem sido atribuída à diminuição da eficiência da regulação do *feedback* da corticosterona no hipotálamo, o que torna o eixo HHA hiper-responsivo ao

estresse [35]. Portanto, juntamente com dados reportados na literatura especializada, sugere-se que o etanol ingerido na vida adulta é um agente agressor que estimula a atividade do eixo HHA na liberação da corticosterona em ratos submetidos à Separação Materna. Além disso, ratos submetidos à Separação Materna que não ingeriram etanol (Wistar), ou seja, não foram submetidos a tal estresse químico, apresentaram diminuição nas concentrações plasmáticas de corticosterona em relação aos controles (sem Separação Materna). Sabe-se que após a ingestão, o etanol plasmático é metabolizado enzimaticamente no fígado para acetaldeído, substância nociva e altamente tóxica ao organismo [45]. Em seguida, a enzima ALDH metaboliza o acetaldeído à ácido acético. Porém a incapacidade de metabolização do acetaldeído na ingestão crônica de etanol e seu acúmulo conduzem à toxicidade orgânica e estimulam a atividade do eixo HHA. Ratos expostos a ingestão crônica de etanol apresentam maior atividade do eixo HHA pela elevada síntese e liberação de CRF (fator liberador de corticotrofina), aumentando os níveis séricos de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e, conseqüentemente, de corticosterona, embora alguns graus de tolerância possam ser observados [47]. Verificou-se ainda que o estímulo da atividade do eixo HHA pela ingestão de etanol acontece em ratos jovens (3-6 meses de idade), sendo que em ratos de meia idade (9 meses) o etanol diminui concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona. Essa liberação de corticosterona das adrenais parece inibir a secreção de testosterona através dos receptores glicocorticóides testiculares localizados no interstício testicular [71,72]. Também a diminuição das concentrações de corticosterona plasmática através da retirada cirúrgica das adrenais tem inibido a secreção de testosterona [73-75]. Portanto, dados na literatura indicam que há níveis ideais de corticosterona plasmática para a adequada produção e liberação de testosterona. Apesar de concentrações plasmáticas de testosterona não terem sido alterados em nosso experimento, alterações de testosterona tecidual e relações parácrinas não devem ser

desprezadas, uma vez que receptores de corticosterona foram encontrados nas células dos túbulos seminíferos [36,76,77] e interstício testicular [36,78,79].

Apesar da hipótese inicial de que elevações de corticosterona provindas da Separação Materna potencializariam os efeitos nocivos decorrentes da ingestão crônica de etanol, observou-se que os ratos UChA e UChB submetidos à Separação Materna apresentaram atrofia testicular menor (diminuição de massa e volume) comparados aos seus controles. Associada à diminuição da atrofia testicular, foi verificado o aumento do volume intersticial testicular com ratos alcoólicos Separação Materna comparados aos controles. A preservação do espaço intersticial testicular é importante para passagem de fluido com substâncias bioativas necessárias ao desenvolvimento e manutenção testicular, pois a diminuição do volume de fluido intersticial pela ingestão de etanol, freqüentemente associada à diminuição de produção de testosterona e atrofia testicular, reflete na supressão da vasopermeabilidade testicular e diminuição do acesso a hormônios, nutrientes, células e substâncias biologicamente ativas direcionadas às células alvo do interstício testicular e túbulo seminífero [80,81,82]. O fluido do espaço intersticial desempenha funções importantes à fertilidade masculina, uma vez que a maioria dos casos de infertilidade idiopática de homens é atribuída a perturbações dos sistemas parácrinos de controle testicular [83]. Além das alterações do interstício testicular, é relatado que a diminuição da produção de espermatozóides pode contribuir para a atrofia testicular [42]. Nesse aspecto, os valores médios de volume e massa testiculares verificados em ratos alcoólicos nivelam paralelamente aos valores de produção espermática diária e número total de espermátides testiculares, existindo tendência a valores maiores em ratos submetidos à Separação Materna do que em ratos controles.

Associado as observações de diminuição da atrofia testicular total e intersticial em ratos submetidos à Separação Materna, somente em animais controles que ingeriram elevada quantidade de etanol (30% dos ratos UChB) foram observadas lesões na estrutura do epitélio

germinativo. As alterações encontradas nos túbulos seminíferos assemelham-se àquelas descritas pela ação de medicamentos quimioterapêuticos radioativos e de testículos expostos a elevadas temperaturas, onde o epitélio encontra-se desprovido de células da linhagem germinativa, restando somente as células de Sertoli [84,85]. Lesões intermediárias no epitélio germinativo, verificando a perda parcial de células espermatogênicas no epitélio seminífero, não foram observadas no estudo morfológico. Sabendo que as células germinativas são sensíveis à ação do etanol ou do acetaldeído, a perda da capacidade de contenção da barreira hemato-testicular causa lesões de grande extensão, como observado em alguns dos ratos UChB. Esse processo foi observado na ruptura de outras barreiras teciduais, como no urotélio, pela ingestão de etanol [86].

Portanto, devido ao conjunto de observações realizadas dos parâmetros reprodutivos dos diferentes grupos, verificou-se que a Separação Materna, durante as duas primeiras semanas de vida, pode atenuar os efeitos prejudiciais encontrados pela ingestão crônica de etanol. Ao observar eventos pós-natais modificando respostas no adulto, verificou-se que o período no qual os animais são submetidos à Separação Materna é crítico ao desenvolvimento do organismo, pois processos vitais como migração celular, proliferação, diferenciação e alguns sistemas de neurotransmissão de excitação e inibição alcançam a maturidade [87,88]. Esse período, caracterizado pela quiescência do eixo HHA em responder com aumento de corticosterona a influências externas (período hipo-responsivo ao estresse - SHRP) é encontrado somente em roedores e parece prevenir e adequar respostas do eixo à atividade futura, relativa às condições ambientais presentes [35,36,89,91]. A Separação Materna sugere um ambiente estressor, pois a ausência da mãe priva os filhotes de cuidados maternos essenciais [12], reduz a temperatura corporal, a frequência da amamentação e os cuidados à excreção [92]. Segundo estudos de Macri & Würbel [1] o estresse ambiental (evocação de medo e estresse) e alterações dos níveis de cuidados maternos podem independentemente ser

usados pelos filhotes como sinal de adversidade do ambiente futuro, ocorrendo ajuste adaptativo do fenótipo, modificando a resposta do sistema neuroendócrino em situações de estresse. Ajustar o fenótipo de acordo com tais indicações do ambiente pode ser altamente adaptável e conseqüentemente favorável à seleção natural [3,7,10]. Assim, em nosso experimento verifica-se que a plasticidade no período SHRP contribui com ajustes adaptativos para a superação das possíveis adversidades futuras à reprodução, pois a Separação Materna apresentou-se atenuadora dos efeitos danosos do etanol a indicadores reprodutivos. Acredita-se que possíveis dificuldades relatadas em manter a saúde do animal, como o surgimento de distúrbios metabólicos [19,32,35-38,93], possam ser originadas em função de modificações em respostas metabólicas na tentativa de manter as funções reprodutivas.

Portanto, foi verificado neste trabalho, sob as condições experimentais aqui empregadas e o modelo biológico adotado que o etanol como agente agressor é capaz de interagir com os efeitos da Separação Materna, evidenciado nas concentrações plasmáticas de corticosterona elevadas e na capacidade de atenuação dos efeitos deletérios do etanol na estrutura do testículo de ratos alcoólicos submetidos à Separação Materna.

Agradecimentos

Este trabalho obteve suporte do CNPq e FAPESP. Nós agradecemos aos laboratórios da Dra. Wilma G. Kempinas e do Dr. Celso R. Franci pela colaboração em análises técnicas. Ao Departamento de Anatomia do IBB/UNESP por disponibilizar suas dependências físicas, material técnico-científico e humano.

Referências Bibliográficas

- [1] Macri S, Würbel H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior* 2006;50:667-80.
- [2] Fenoglio KA, Brunson KL, Baram TZ. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: Functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2006;27:180-92.
- [3] Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430:419-421.
- [4] De Bellis MD, Keshavan MS, Clark DB, et al. Developmental traumatology part II: brain development. *Biology Psychiatry* 1999;45:1235-6.
- [5] Teicher, MH. Wounds that time wouldn't heal: the neurobiology of childhood abuse. *Cerebrum* 2000;2:50-67.
- [6] Pryce CR, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2003;27:57-71.
- [7] Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG, Bateson P. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2005;272:671-7.
- [8] McNamara JM, Houston AI. State-dependent life histories. *Nature* 1996;380:215-21.
- [9] Houston AI, McNamara JM. Phenotypic plasticity as a state-dependent life-history decision. *Evolutionary Ecology* 1992;6:243-53.
- [10] Sih A, Bell A, Johnson JC. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview *Trends in Ecology & Evolution* 2004;19:372-8.

- [11] Agid O, Shapira B, Zislin J, et al. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 1999;4:163-72.
- [12] Meaney, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci.*, v.24, p.1161–92, 2001.
- [13] Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB. Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am. J. Psychiatry* 2002;159:1265-83.
- [14] Johnson JG, Cohen P, Gould MS, Kasen S, Brown J, Brook JS. Childhood Adversities, Interpersonal Difficulties, and Risk for Suicide Attempts During Late Adolescence and Early Adulthood. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:741-49
- [15] Pryce CR; Feldon, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2003;27:57-71.
- [16] Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav* 2005;29:649-74
- [17] Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatry* 2001;49:1023–39.
- [18] Heim C, Newport DJ, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Altered Pituitary-Adrenal Axis Responses to Provocative Challenge Tests in Adult Survivors of Childhood Abuse. *Am J Psychiatry* 2001;158:575-81.
- [19] Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary.-adrenal responses to stress. *Science* 1997;277:1659-62.

- [20] Caspi A; Moffitt TE.; Morgan J, et al. Maternal Expressed Emotion Predicts Children's Antisocial Behavior Problems: Using Monozygotic-Twin Differences to Identify Environmental Effects on Behavioral Development. *Developmental Psychology* 2004;40:149-61.
- [21] Langeland W, Draijer N, van den Brink W. Psychiatric comorbidity in treatment-seeking alcoholics: the role of childhood trauma and perceived parental dysfunction. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:441–7.
- [22] Kim-Cohen J, Moffitt TE, Taylor A, Pawlby SJ, Caspi A. Maternal Depression and Children's Antisocial Behavior. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:173-81.
- [23] Gilmer WS, McKinney WT. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *J Affect Disord* 2003;75:97–113.
- [24] Matthews K, Robbins TW. Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003;27:45–55.
- [25] Huot RL, Thirivikraman K, Meaney MJ, Plotsky PM. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 2001;158:366–373.
- [26] Gordon HW. Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:115–26.
- [27] 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* 2003;121:787-99.
- [28] Kosten TA, Miserendino MJ, Kehoe P. Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Brain Res.* 2000;875:44-50.
- [29] Roman E, Gustafsson L, Hyytiä P, Nylander I. Short and prolonged periods of maternal

separation and voluntary ethanol intake in male and female ethanol-preferring AA and ethanol-avoiding ANA rats. *Alcohol* 2005;29:541-601.

[30] Holmes A, Le Guisquet A-M, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2005;29:1335-46.

[31] Kuhn CM, Pauk J, Schanberg SM. Endocrine responses to mother–infant separation in developing rats. *Dev. Psychobiol.* 1999;23:395–410.

[32] Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.* 2002;20:52-63.

[33] Bateson, P. Fetal experience and good adult design. *International Journal of Epidemiology* 2001;30:928-34.

[34] Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 2000;122:81– 103

[35] Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, Agnati LF. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16:187-97.

[36] Biagini G, Pich EM. Corticosterone administration to rat pups, but not maternal separation, affects sexual maturation and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the testis. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73:95-103.

[37] Lehmann J, Russig H, Feldon J, Pryce CR. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 2002;73:141-5.

- [38] Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1993;18:195–200.
- [39] Plotsky PM, Thirvikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:2192-204.
- [40] Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregón E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2000;32:175-84.
- [41] Kim JH, Kim HJ, Noh HS, et al. Suppression by ethanol of male reproductive activity. *Brain Research* 2003;989:91–98.
- [42] Oliva SU, Messias AG, Silva DA, Pereira OC, Gerardin DC, Kempinas WG. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reprod Toxicol* 2006;22:599-605.
- [43] Weinberg J, Vogl AW. Effects of ethanol consumption on the morphology of the rat seminiferous epithelium. *Journal of Andrology* 1988;9:261-9.
- [44] Wallock-Montelius LM, Villanueva JA, Chapin RE, et al. Chronic Ethanol Perturbs Testicular Folate Metabolism and Dietary Folate Deficiency Reduces Sex Hormone Levels in the Yucatan Micropig. *Biology Of Reproduction* 2007;76:455–65.
- [45] Haddad JJ. Alcoholism and neuro-immune-endocrine interactions: physiochemical aspects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (2004) 361–371
- [46] Ren J, Banan A, Keshavarzian A, et al. Exposure of ethanol induces oxidative damage in the pituitary gland. *Alcohol* 2005;35:91-101.
- [47] Emanuele MA, Emanuele N. Alcohol and the Male Reproductive System. *Alcohol Research & Health*; 2001;25:234-45.

- [48] Van Thiel DII, Gavalier JS, Cobb CII, Sherins RJ, Lester R. Alcohol induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology* 1979;105:888-95
- [49] Anderson Jr RA, Willis BR, Phillips JF, Oswald C, Zaneveld, LJD. Delay pubertal developmental of the male reproductive tract associated with chronic athanol ingestion. *Biochm.Pharmacol.*, 1987;36:2157-67.
- [50] Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1983;5:171-8.
- [51] Robb GW, Amann RP, Killian, GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adults rats. *J. Repr. Fert.* 1978;54:103-107.
- [52] Hayashi H, Cedenho AP. Estudos histométricos do testículo: escrotal criptorquidismo unilatena e bilateral. *Ver. Brás. Pesq. Med. Biol.* 1974;7:383-8.
- [53] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1963;12:131-55.
- [54] Banzatto AD, Kronka SN. *Experimentação agrícola.* Jaboticabal: Funep, 1989. 247p.
- [55] Quintanilla ME, Tampier L. Acetaldehyde-reinforcing effects: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats: *Alcohol* 2003;31:63–9.
- [56] Roman E, Nylander I. The impact of emotional stress early in life on adult voluntary ethanol intake-results of maternal separation in rats. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 2005;8:157-74.
- [57] Lieber CS. The metabolism of Alcohol. *Scientific American* 1976;234:25-33.
- [58] Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1991;15:573-92.

- [59] Salonen I, Huhtaniemi I. Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat. *Biology of Reproduction* 1990;2:55-62.
- [60] Salonen I, Huhtaniemi I. Specific and weight loss-associated effects of one-week exposure to ethanol on pituitary-gonadal function of male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988;119:99-105.
- [61] Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C, Zaneveld LJ. Male reproductive tract sensitivity to ethanol: a critical overview. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18:305-10.
- [62] Gantt PA, Tho PT, Bhalla VK, McDonough PG, Costoff A, Mahesh VB. Effect of ethanol-containing liquid diet upon gonadotropin receptor depletion in rat testis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1982;223:848-53.
- [63] Gavaler JS, Perez HA, Estes L, Van Thiel DH. Morphologic alterations of rat Leydig cells induced by ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18:341-7.
- [64] Van Thiel DH, Gavaler JS, Cobb CF, Santucci L, Graham TO. Ethanol, a Leydig cell toxin: evidence obtained in vivo and in vitro. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18:317-323.
- [65] Salonen I, Eriksson CJP. Penetration of Ethanol into the Male Reproductive Tract. *Alcoholism: Clinical And Experimentals Earch* 1989;13:146-51.
- [66] Bart J, Groen HJ, van der Graaf WT, Hollema H, Hendrikse NH, Vaalburg W, Sleijfer DT, de Vries EG. An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol.* 2002;3:357-63.
- [67] Pelletier R-M, Byers SW. The blood-testis barrier and sertoli cell junctions: Structural considerations. *Microscopy Research and Technique* 1992;20:3-33.
- [68] Dave DS, Leppert JT, Rajfer J. Is the Testis a Chemo-Privileged Site? Is There a Blood-Testis Barrier? *Rev Urol.* 2007;9:28–32.

- [69] Hennessy MB. Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997;21:11-29.
- [70] Vázquez DM. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 1998;23:663-700.
- [71] Bambino TH, Hsueh A JW. Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1981;108: 2142-8.
- [72] Feek CM, Tuzi NL, Edwards CRW. The adrenal gland and progesterone stimulates testicular steroidogenesis in the rat in vivo. *J. Steroid Biochem.* 1989;32:573-579.
- [73] Frankel AI, Ryan EL. Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. *Biol. Reprod.* 1981;24: 491-5.
- [74] Kalra PS, Kalr ASP. Circadian periodicities of serum androgens, protesterone, gonadotropins and luteinizing hormone-releasing hormone in male rats: The effects of hypothalamic deafferentation, castration and adrenalectomy. *Endocrinology* 1977;101:1821-7.
- [75] Lescoat G, Lescoat D, Garnier DH. Influence of adrenalectomy on maturation of gonadotropin function in the male rat. *J. Endocrinol.* 1982;95: 1-6.
- [76] Biagini G, Merlo Pich E, Frasoldati A, Agnati LF, Marrama P. Changes in glucocorticoid receptor immunoreactivity after adrenalectomy and corticosterone treatment in the rat testis. *J Endocrinol Invest.* 1995;18:384-90.
- [77] Levy FO, Ree AH, Eikvar L, Govindan MV, Jahnsen T, Hansson V. Glucocorticoid receptors and glucocorticoid effects in rat Sertoli cells. *Endocrinology*, 1989;124:430-6.
- [78] Evain D, Morera AM, Saez JM. Glucocorticoid receptors in interstitial cells of the rat testis. *J Steroid Biochem.* 1976;7:1135-9.

- [79] Stalker A, Hermo L, Antakly T. Covalent affinity labeling, radioautography, and immunocytochemistry localize the glucocorticoid receptor in rat testicular leydig cells. *American Journal of Anatomy*. 1989;186:369–77.
- [80] Adams ML, Little PJ, Bell B, Cicero TJ. Alcohol Affects Rat Testicular Interstitial Fluid Volume and Testicular Secretion of Testosterone and β -Endorphin. *THE JOURNAL OF Pharmacology And Experimental Therapeutics* 1991;258:1008-14
- [81] Adams ML, Cicero TJ. Effects of alcohol on β -endorphin and reproductive hormones in the male rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1991.
- [82] Sharpe RM. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol. Reprod.* 30: 29-49, 1984.
- [83] Sharpe RM. Endocrinology and paracrinology of the testis. In *Physiology and Toxicology of Male Reproduction*. Academic Press, 1988:71-102.
- [84] Mesquita SFP, Hisasi C, Cortez D, Pomin T, Felix JS. Alterações testiculares em ratos pré-púberes após tratamento subcrônico com doxorubicina. *Boletim do Centro da Biologia da Reprodução, Juiz de Fora*. 2000;19:21-32.
- [85] Miraglia SM, Hayashi H. Histomorphometry of immature rat testis after heating. *Journal of Morphology* 2005;217:65–74.
- [86] Mello Junior W, Garcia PJ, Cagnon VHA, Martinez M, Martinez FE. Morphologic Changes In The Vesical Transition Epithelium Of Alcoholic Rats. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1997;29:393-9.
- [87] González AS, Rodríguez Echandía EL, Cabrera R, Fóscolo MR, Fracchia LN. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiol. Behav.* 1990;47:735-41.

- [88] González AS, Rodríguez Echandía EL, Cabrera R, Fóscolo MR. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. II. Effects on estrous cycles in females. *Physiol. Behav.* 1994;56:591-5.
- [89] Schmidt MV, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. The postnatal development of the hypothalamic-adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2003;21:125-32.
- [90] Smith MA, Kim S-Y, Van Oers HJJ, Levine S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology* 2006;24:293.
- [91] Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 2003;68:439-45.
- [92] Hofer, M.A. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 1996;21:203–17.
- [93] Martins, OA. Estresse, alcoolismo e vitamina E: avaliação de parâmetros bioquímicos e morfofisiologia prostática. Botucatu, UNESP, 2007

Tabela 1

Ingestão média diária de etanol durante o período de tratamento (g/kg/dia) de ratos UChA e UChB submetidos a Separação Materna (SM) e Controle (Co)

Linhagens	Grupos experimentais	
	SM	Co
UChB	7,03 ± 0,3B	6,53 ± 0,45 B
UChA	1,69 ± 0,16 A	2,09 ± 0,20 A

Os dados representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.). Letras diferentes indicam os grupos que diferem estatisticamente ($p < 0.05$). A ingestão de etanol é expressa em gramas por quilogramas de peso corpóreo por dia.

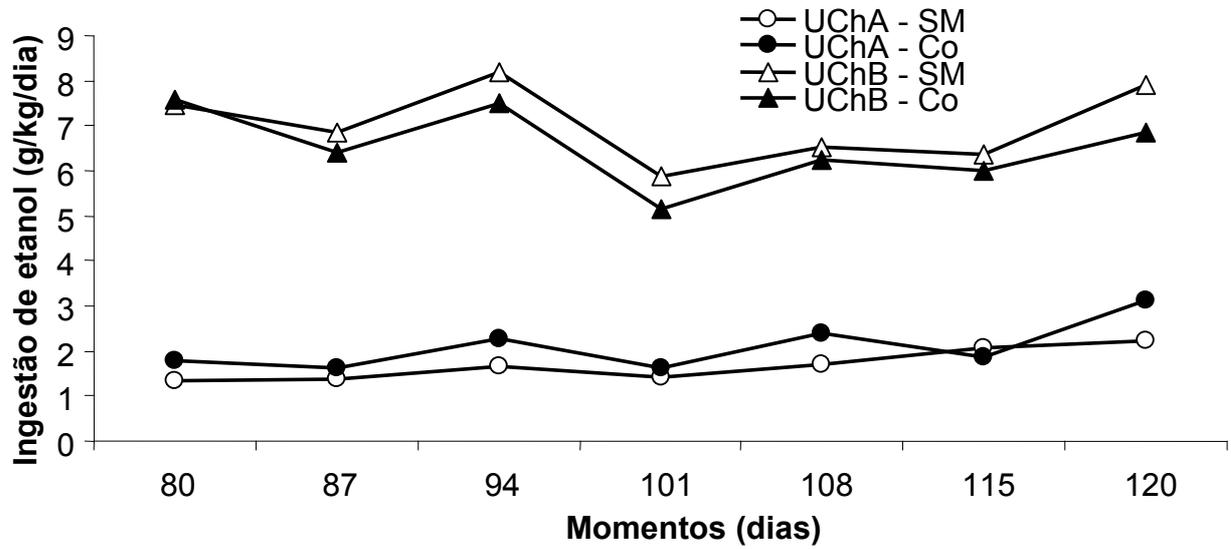


Figura 1. Média da ingestão de etanol (g/kg/dia) de ratos (UChA e UChB) submetidos à Separação Materna (SM) e Controle (Co) durante vários momentos do experimento.

Tabela 2

Volume, massa dos testículos (relativa e absoluta) e corpórea dos ratos Separação Materna (SM) e Controle (Co) das linhagens UChA, UChB e Wistar.

Parâmetros	Grupos-Linhagens					
	SM-UChB	Co-UChB	SM-UChA	Co-UChA	SM-Wistar	Co-Wistar
Massa corpórea(g)	350,0±13,2bA	315,7±10,2aA	364,0±4,9aA	371,1±4,7aB	398,2±8,9aB	385,0±9,9aB
MT Esquerdo(g)	1,57±0,05bA	1,29±0,08aA	1,66±0,03bAB	1,55±0,03aB	1,87±0,07aB	1,89±0,02aC
MT Direito (s/alb.)(g)	1,50±0,03bA	1,23±0,08aA	1,55±0,03bA	1,43±0,03aA	1,74±0,06aB	1,76±0,03aB
VT Esquerdo (mm ³)	1586±58bA	1238±75aA	1641±37bA	1497±58aB	1938±100aB	1971±39aC
MrT	0,43±0,011aA	0,41±0,017aA	0,45±0,006aA	0,40±0,007bA	0,44±0,009aA	0,47±0,015bB

Os dados representam as médias ± E.P.M. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. As letras maiúsculas representam a diferença entre linhagens e as minúsculas entre as condições experimentais SM e Co. Legenda: MT = massa do testículo, VT = volume do testículo, MT (s/alb.) = massa do testículo sem a túnica albugínea e Mr = massa relativo.

Tabela 3

Parâmetros de contagem espermática das linhagens submetidas à Separação Materna (SM) e Controle (Co).

Parâmetros	Grupos-Linhagens					
	SM-UChB	Co-UChB	SM-UChA	Co-UChA	SM-Wistar	Co-Wistar
Número de espermátides (x10 ⁶ /testículo)	180,1±7,52	155,6±16,11	170,3±11,37	164,5±5,59	190,1±10,28	198,8±12,15
Número de espermátides (x10 ⁶ /g/testículo)	119,5±4,48	124,3±5,23	109,4±5,40	115,4±3,39	108,8±5,74	112,8±5,80
Produção espermática diária (x10 ⁶ /testículo/dia)	29,53±1,23	25,50±2,64	27,91±1,86	26,96±0,91	31,17±1,68	32,59±1,99
Produção espermática diária (x10 ⁶ /g/testículo/dia)	19,60±0,73	20,38±0,85	17,93±0,88	18,91±0,55	17,84±0,94	18,49±0,95

Os dados representam as médias ± E.P.M.

Tabela 4

Volume dos túbulos e interstício testiculares dos ratos Separação Materna (SM) e Controle (Co) das linhagens UChA, UChB e Wistar.

Linhagens	Grupos	Volume (mm ³)	
		Interstício	Túbulo Seminífero
UChB	SM	78,55 ± 2,91bB	1507,55 ± 55,85bA
	Co	59,73 ± 3,64aA	1179,16 ± 71,87aB
UChA	SM	104,58 ± 1,64bA	1537,39 ± 24,14bA
	Co	86,19 ± 3,39aA	1411,29 ± 55,54aA
Wistar	SM	211,10 ± 10,90aC	1726,92 ± 89,22aA
	Co	224,52 ± 4,54aC	1746,92 ± 35,32aC

Os dados representam as médias ± E.P.M. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. As letras maiúsculas representam a diferença entre linhagens e as minúsculas entre as condições experimentais SM e Co.

Tabela 5

Concentrações hormonais plasmáticas de LH, FSH, testosterona e corticosterona (ng/ml), das linhagens (UChA, UChB e Wistar) submetidas à Separação Materna (SM) e Controle (Co)

Linhagem	Grupos	Hormônios			
		FSH	LH	Testosterona	Corticosterona
UChB	Controle	10,9±0,9 aA	0,3±0,1 aA	0,4±0,1 aA	30,3±7,4 aA
	Separação	9,9±2,0 aA	0,6±0,2 aA	0,3±0,0 aA	67,2±9,4 bB
UChA	Controle	11,6±1,1 aA	0,7±0,3 aA	0,4±0,3 aA	15,7±5,2 aA
	Separação	11,2±1,4 aA	2,0±0,6 bB	0,5±0,2 aA	39,2±14,7 aAB
Wistar	Controle	10,6±2,5 aA	0,8±0,2 aA	1,1±0,3 aA	46,5±11,3 bA
	Separação	6,9±1,0 aA	0,5±0,3 aA	0,7±0,1aA	18,3±5,8 aA

Os dados representam as médias ± E.P.M. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. As letras maiúsculas representam a diferença entre linhagens e as minúsculas entre as condições experimentais SM e Co.

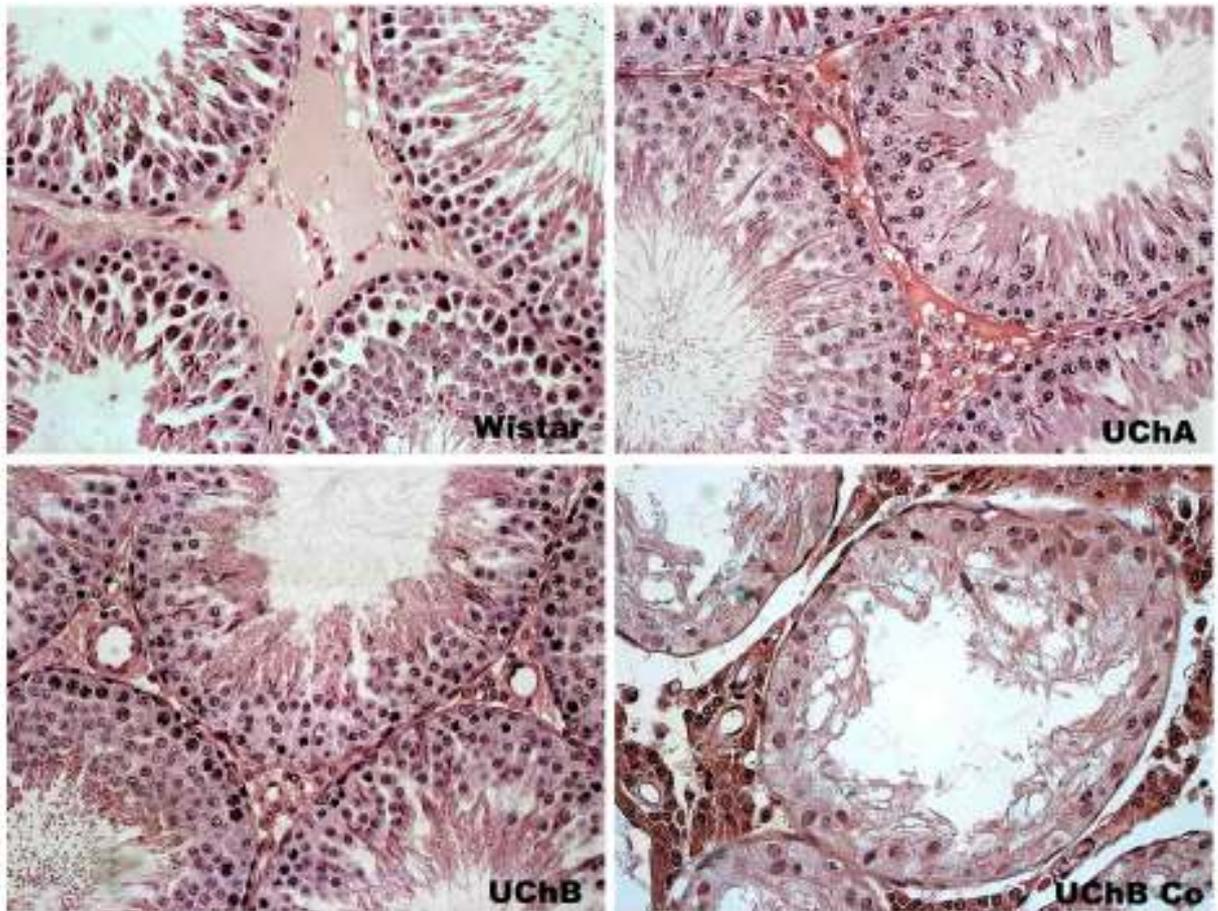


Figura 2. Fotomicrografia dos interstícios testiculares dos animais Wistar, UChA e UChB. Em UChB Co (Controle), evidencia-se alterações presentes em 30% dos túbulos seminíferos de ratos bebedores não manipulados com o procedimento de separação materna. Coloração em H.E.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o etanol, como agente agressor, sob as condições experimentais aqui empregadas e o modelo biológico adotado, é capaz de interagir com os efeitos da Separação Materna, evidenciado nas concentrações plasmáticas de corticosterona elevadas e na capacidade de atenuação dos efeitos deletérios do etanol na estrutura do testículo de ratos alcoólicos submetidos à Separação Materna.

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](#)