

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Gabriela Almeida Motta

**Efeitos de diferentes doses de
degarelix nos níveis séricos de
testosterona e avaliação
histomorfométrica do pênis de ratos
Wistar.**

UFCSPA
**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2015**

Gabriela Almeida Motta

**Efeitos de diferentes doses de
degarelix nos níveis séricos de
testosterona e avaliação
histomorfométrica do pênis de ratos
Wistar.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de
Mestre

Orientador: Dr. Ernani Luis Rhoden
Co-orientadora: Dr^a. Cláudia Ramos Rhoden

**Porto Alegre
2015**

Dedico este trabalho aos meus pais Ângela e Eduardo.

RESUMO

O hipogonadismo é uma síndrome altamente prevalente, relacionado com disfunção erétil (DE), baixo libido e alterações de massa corporal. O diagnóstico é baseado em sintomas clínicos e valores subnormais de testosterona (T). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes doses de degarelix, um antagonista do receptor do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), na T sérica e relacionar os valores com a histomorfometria do pênis de ratos Wistar. Animais foram divididos em 6 grupos: controle (n = 9-10): animais intactos recebendo veículo (solução manitol 5%) ; Orquiec + veículo (n = 7-7): animais submetidos a orquiectomia bilateral e recebendo veículo; Degarelix 200 (n = 8-10): animais intactos recebendo doses de degarelix 200 µg/Kg; Degarelix 400 (n = 8-9): animais intactos recebendo doses de degarelix 400 µg/Kg; Degarelix 600 (n = 6-9): animais intactos recebendo doses de degarelix 600 µg/Kg e Degarelix 800 (n = 8-10): animais intactos recebendo doses de degarelix 800 µg/Kg. A cada dez dias, durante 60 dias, os animais receberam soluções de degarelix ou veículo via subcutânea (sc). O conteúdo de musculatura lisa, colágeno e fibras elásticas do corpo cavernoso (CC) foram avaliados por morfometria microscópica específica. T sérica foi mensurada por quimioluminescência. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando valores de P foram $\leq 0,05$. Ao longo do estudo, a T sérica nos grupos Orquiec + veículo, Degarelix 600 e 800 foi semelhante, atingindo níveis similares aos castrados. O grupo Degarelix 400 atingiu níveis de T sérica similar aos castrados somente após a quarta administração (P <0,001). Após 60 dias de tratamento, nos mesmos grupos citados acima, os níveis de T atingiram os observados nos animais castrados (P <0,001). O peso corporal aumentou nos grupos Controle e Orquiec + veículo quando comparados os dias 0 e 60 (P = 0,001), porém comparando os grupos entre si no dia 60 houve menor peso corporal no grupo Orquiec + veículo quando comparado ao grupo controle (P = 0,001). O conteúdo de musculatura lisa trabecular foi menor no grupo Orquiec + veículo comparado aos grupos Controle e Degarelix 200 (P = 0,003). O conteúdo do espaço sinusoidal foi menor em todos os grupos comparados ao Controle (P <0,001). Estes resultados mostram que doses crescentes de degarelix são capazes de induzir queda nos níveis séricos de T compatíveis com hipogonadismo, em ratos. Diferentes doses de degarelix produziram níveis de T similares aos de animais normais e castrados, mas com todas as doses utilizadas houve alteração da estrutura do CC peniano de ratos.

Palavras-chave: Níveis de T. Degarelix. Hipogonadismo. Histomorfometria. Modelo animal.

ABSTRACT

Hypogonadism is a highly prevalent syndrome and is associated with erectile dysfunction (ED), low libido and changes in body mass. The diagnosis is based on clinical symptoms and subnormal values of testosterone (T). The aim of this study was to evaluate the effect of different doses of degarelix, an antagonist of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor, on serum T and to associate serum T with penile histomorphometry in Wistar rats. Animals were divided into 6 groups: Control (n = 9-10): intact animals receiving vehicle (5% mannitol solution); Orchiec + vehicle (n= 7): animals that underwent bilateral orchiectomy and received vehicle; Degarelix 200 (n = 8-10): intact animals receiving doses of degarelix at 200 µg/Kg; Degarelix 400 (n = 8-9): intact animals receiving doses of degarelix at 400 µg/Kg; Degarelix 600 (n = 6-9): intact animals receiving doses of degarelix at 600 µg/Kg and Degarelix 800 (n = 8-10): intact animals receiving doses of degarelix at 800 µg/Kg. Every 10 days, for 60 days, the animals received vehicle or solutions of degarelix subcutaneously (s.c.). The content of smooth muscle, collagen and elastic fibers of the corpus cavernosum (CC) were evaluated by specific microscopic morphometry. Serum T was measured by chemiluminescence. The results were considered statistically significant when P values were ≤ 0.05 . Throughout the study, the serum T in Orchiec + vehicle, Degarelix 600 and Degarelix 800 groups decreased, and Degarelix 400 group reaching similar levels after the fourth administration ($P < 0.001$). After 60 days of treatment, in the same groups above mentioned, T levels reached those observed in the castrated animals ($P < 0.001$). Body weight increased in both Control and Orchiec + vehicle groups, when comparing day 0 and day 60 ($P = 0.001$), but when comparing the groups on day 60, rats had a lower body weight in the Orchiec + vehicle group compared with the Control group ($P = 0.001$). The quantity of the trabecular smooth muscle was lower in Orchiec + vehicle group compared with the Control and Degarelix 200 groups ($P = 0.003$). The area of the sinusoidal space was lower in all groups compared with the Control group ($P < 0.001$). These results demonstrate that increasing doses of degarelix are able to decrease serum T levels to the levels observed in rats with hypogonadism. In conclusion, degarelix produced T levels similar to those of normal and castrated animals, depending on the dose, and all doses of degarelix (200-800 µg/Kg) modified the structure of the penile CC of rats.

Key-words: T levels. Degarelix. Hypogonadism. Histomorphometry. Animal model.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT	Terapia de Privação Androgênica
CaP	Câncer de Próstata
CC	Corpo Cavernoso
DAS	Deficiência Androgênica Sintomática
DHT	Diidrotestosterona
DCV	Doença Cardiovascular
DE	Disfunção Erétil
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DT	Deficiência de Testosterona
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hematoxilina-Eosina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IM	Infarto do Miocárdio
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante
LHRH	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
MEC	Matriz Extracelular
NO	Óxido Nítrico
NOSe	Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
NOSn	Óxido Nítrico Sintetase Neuronal
PDE5	Fosfodiesterase 5
PDE5-I	Inibidores da Fosfodiesterase 5
PIC	Pressão Intracavernosa
RA	Receptor Androgênico
SHBG	Globulina de Ligação de Hormônios Sexuais
SNC	Sistema Nervoso Central
TAV	Tecido Adiposo Visceral
TGF- β 1	Fator Transformador de Crescimento Beta 1

TRT	Terapia de Reposição de Testosterona
TSP1	Trombospondina 1
T	Testosterona
SC	Subcutânea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 ANATOMIA E HISTOMORFOMETRIA DO PÊNIS	8
1.2 EREÇÃO E DISFUNÇÃO ERÉTIL	10
1.2.1 Testosterona X ereção	15
1.3 HIPOGONADISMO	20
1.3.1 Síntese e regulação de testosterona	20
1.3.2 Definição	21
1.3.3 Classificação	22
1.3.4 Causas	23
1.3.5 Efeito da Testosterona e sua ausência	23
1.3.6 Prevalência, incidência, mortalidade e fatores associados	26
1.3.7 Coleta e diagnóstico	29
1.3.8 Tratamento	32
1.4 TERAPIAS DE PRIVAÇÃO ANDROGÊNICA.....	33
1.4.1 Castração cirúrgica ou orquiectomia bilateral	34
1.4.2 Castração química ou médica utilizando agonistas e antagonistas	34
1.4.2.1 Agonistas do GnRH.....	34
1.4.2.2 Antagonistas do GnRH.....	35
1.4.3 Avaliação dos diferentes processos de “castração”	35
1.5 HIPOGONADISMO EM ANIMAIS	37
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 ARTIGO	42
5 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	86
ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA E HISTOMORFOMETRIA DO PÊNIS

O corpo principal do pênis é constituído por três estruturas eréteis, dois corpos cavernosos (CC), direito e esquerdo, e o corpo esponjoso o qual é mediano. A superfície posterosuperior do pênis durante a ereção é chamada dorsal, e a superfície oposta é a ventral. Os CC formam a maior parte do corpo do pênis, ocupando a face dorsal do mesmo e são separados por um septo fibroso mediano incompleto, o qual permite que a circulação sanguínea entre os dois corpos seja efetuada. O corpo esponjoso situa-se ventralmente aos CC e é atravessado pela uretra. Envolvendo os corpos esponjoso e cavernosos, localiza-se um envoltório fibroso denso, a túnica albugínea. (SUSAN *et al.*, 2008).

Semelhantemente ao homem, o pênis do rato possui um par de CC, situados dorsalmente ao corpo esponjoso, além de fâscias, nervos e vasos, todos recobertos pela pele, e a da túnica albugínea envolvendo os corpos eréteis. Porém, algumas diferenças podem ser observadas entre estas duas espécies. No rato os CC estão unidos entre si, mas separados no homem como já mencionado. Além disso, existe um processo ósseo localizado distalmente no pênis do rato (QUINLAN *et al.*, 1989), o que não acontece no pênis humano.

O CC é a principal estrutura envolvida na ereção, sendo composto por fibras musculares lisas, vasos sanguíneos, terminais nervosos autônomos e matriz intersticial composta principalmente por colágeno e sistema elástico, permitindo alongamento e rigidez na ereção e elasticidade adequada para o retorno ao estado flácido (GOLDSTEIN *et al.*, 1985; PINHEIRO *et al.*, 2000). O conteúdo do corpo cavernoso trabecular é composto principalmente de musculatura lisa trabecular e matriz de tecido conjuntivo extracelular (MEC) (NEHRA *et al.*, 1996).

Pinheiro e colaboradores (2000) observaram que o corpo cavernoso do rato é marcadamente diferente do humano em conteúdo e organização, contendo menor quantidade de células musculares lisas, melhores quantidades de colágeno e com a presença de colágeno fibrilar e células musculares lisas

em camadas subendoteliais, e por isso ressaltou a importância de considerar estes resultados quando utilizados modelos de ratos para ereção em experimentos (PINHEIRO *et al.*,2000).

As células musculares lisas do pênis do rato têm uma localização discreta na trabécula, na região subendotelial do CC e foram encontradas como menor constituinte do corpo cavernoso, representando 9,1% da densidade volumétrica do mesmo (PINHEIRO *et al.*,2000), enquanto que no homem a porcentagem média de conteúdo de musculatura lisa trabecular foi encontrada em uma faixa de 42 a 50% (NEHRA *et al.*,1996). A musculatura trabecular lisa também sintetiza tecido conjuntivo, como o colágeno, mostrando uma possível regulação da síntese e degradação de tecido conjuntivo pelas células da musculatura lisa trabecular (NEHRA *et al.*,1995).

O colágeno é encontrado como componente predominante da trabécula, compreendendo 62,7% de densidade volumétrica do corpo cavernoso do rato. Estão dispostos em feixes densos trabeculares e fibrilas no espaço subendotelial do corpo cavernosos do rato consistindo principalmente os tipos de colágeno I e III, respectivamente. Os feixes grossos de colágeno observados na trabécula acabam por serem proteínas estruturais importantes por se tratar de tecido submetido a fortes alongamentos (PINHEIRO *et al.*,2000). O colágeno tipo I é o mais comum e acomete cerca de 90% do colágeno total nos mamíferos. (NORTON, 1993; HENRIKSEN *et al.* 2011). O tipo III é geralmente associado com o tipo I em diferentes proporções (NORTON, 1993). O colágeno tem grande importância ao conferir força de tensão ao tecido, porém seu acúmulo é frequentemente prejudicial . Em tecidos lesionados, pode-se observar o aumento do conteúdo de colágeno com maior quantidade de fibras espessas (RICH e WHITTAKER, 2005).

Calvi e colaboradores (2012) examinaram métodos histológicos e histomorfométricos para a quantificação de colágeno comparando colorações histológicas como Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson, Reticulina, Picrossírius e reação imunohistoquímica para colágeno I,II,III, IV e V. Para a quantificação histomorfométrica foi utilizado programa de computador UTHSCSA. (CALVI *et al.*, 2012). Os métodos que apresentaram maior facilidade para quantificação de colágeno foram Masson e Picrossírius. O método de imunohistoquímica pode identificar vários tipos de colágeno, porém

possui alto custo e maior complexidade na técnica (CALVI *et al.*, 2012). Métodos tradicionais para detecção de fibras colágenas, como Van Gieson e varias formas de tricrômicos, podem falhar ao revelar muitas fibras de colágeno finas, podendo subestimar a quantidade de colágeno. (KIERNAN, 2000).

Tecidos que são submetidos constantemente a força de tensão, como o pênis, são ricos em fibras elásticas. As fibras elásticas são grandes e complexas macromoléculas da MEC. São importantes porque conferem propriedades mecânicas críticas em tecidos elásticos e regulam o destino de células em tecidos em desenvolvimento, como vasos sanguíneos. (KIELTY *et al.*, 2002). As fibras elásticas foram encontradas como principal componente da MEC de pênis de coelho (MAIA *et al.*, 2006).

A concentração de fibras elásticas em homens adultos representa 9% do volume do corpo cavernoso (SATTAR *et al.*, 1994), diferentemente do rato que possui uma menor concentração, equivalente a 4,9%. Além disso, possuem também diferente organização no CC do rato comparado ao homem (PINHEIRO *et al.*, 2000).

Análises morfométricas de componentes teciduais e celulares podem ser usadas para diagnósticos e prognósticos: têm como objetivo eliminar a subjetividade e aumentar a reprodutibilidade (ANDREA *et al.*, 2008). A metodologia estereológica, com a coloração de Weigert, pode ser usada para determinar a densidade volumétrica de fibras elásticas no pênis de rato (PINHEIRO *et al.*, 2000), podendo evitar vieses de super ou subestimativa de estruturas que ocorrem em análises de imagem automática ou semiautomática (SATTAR *et al.*, 1994).

1.2 EREÇÃO E DISFUNÇÃO ERÉTIL

As estruturas acima mencionadas (musculatura lisa, fibras colágenas e elásticas) são de grande importância para a função erétil. Vários estudos comprovam a relação do conteúdo do CC com o funcionamento normal da ereção e sua disfunção na ausência de integridade destas estruturas. (NEHRA *et al.*, 1996; CLARO *et al.*, 2005; CABRINI *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2006; SHAMLOUL & GHANEM, 2013)

Para o processo de ereção do pênis estão envolvidos o aumento do fluxo arterial peniano, o relaxamento da musculatura lisa cavernosa e a compressão do retorno venoso. Sob estimulação sexual, ocorre um impulso nervoso que promove a liberação de neurotransmissores do nervo cavernoso e fatores de relaxamento de células endoteliais do pênis levando ao aumento do fluxo sanguíneo devido ao relaxamento da musculatura lisa de artérias e arteríolas penianas. O relaxamento da musculatura lisa trabecular e a oclusão do retorno venoso, gerado pela compressão do plexo venular existente entre as trabéculas e túnica albugínea, promovem a expansão do espaço sinosoidal (LUE, 2000)

A ativação de receptores adrenérgicos nas artérias cavernosas e musculatura lisa trabecular levam a uma redução no fluxo sanguíneo e colapso dos espaços lacunares (sinusóides), que por sua vez descomprimem o plexo venular cavernoso permitindo o retorno venoso, e assim gerando a detumescência do pênis (SHAMLOUL & GHANEM, 2013). A resposta erétil no pênis do rato, em comparação com homem, envolve basicamente a mesma sequência de eventos e muitos dos mesmos neurotransmissores, porém podendo haver alguma diferença no mecanismo de veno-oclusão (MILLS *et al.*, 1996).

Quando há inability de atingir e manter uma ereção suficiente para uma relação sexual satisfatória diz-se que ocorreu o processo de disfunção erétil (DE) (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT, 1993). Esta é uma desordem médica comum que atinge principalmente homens com mais de 40 anos de idade. (LEWIS *et al.*, 2010). Estima-se que a prevalência de DE alcance aproximadamente 322 milhões de casos no ano de 2025, um aumento aproximado de 170 milhões desde o ano de 1995 (AYTA *et al.*, 1999).

Muitos fatores estão envolvidos na DE, fatores psicológicos como o medo de falhar durante a relação, fatores neurológicos como esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e fatores de risco para a insuficiência arterial do pênis como hipertensão, hiperlipidemia, fumo, diabetes mellitus (DM), além de fatores endócrinos (SHAMLOUL & GHANEM, 2013). Muitos fatores de risco cardiovasculares, prognósticos para doença

cardiovascular (DCV), também estão associados com DE (GIULIANO, 2008), sendo a própria DE reconhecida como forte preditor de DCV (NEHRA *et al.*, 2012).

A disfunção endotelial está rigorosamente associada com DE, já que o endotélio é fundamental para a fisiologia da ereção (GIULIANO, 2008). O endotélio vascular, a partir de estímulos, libera fatores que alteram a contratilidade e relaxamento da musculatura lisa vascular, sendo assim importante para o controle do fluxo sanguíneo (PRIETO, 2008). Fumo, hipercolesterolemia e diabetes são condições que levam a deficiência arterial e alteração no relaxamento muscular gerando alterações na estrutura e circulação do pênis, portanto, associadas com prejuízo funcional de nervos e endotélio (ANDERSSON, 2003). A Hipertensão e a exposição ao fumo não são os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de DE, porém de forma independente ou junto com outras comorbidades elevam o risco de comprometer a função erétil (CELLEK *et al.*, 2012).

A disfunção endotelial também está comumente relacionada com diminuição de produção de óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*), mediador da ereção peniana (BURNETT, 2006), e consequente diminuição do relaxamento da musculatura lisa (GIULIANO, 2008). O NO neurogênico, gerado pela óxido nítrico sintetase neuronal (NOSn), é o fator mais importante na mediação para o relaxamento de vasos e o corpo cavernoso do pênis, enquanto que o NO endotelial, gerado pela óxido nítrico sintetase endotelial (NOSe), é considerado essencial para manter a ereção (ANDERSSON, 2003). Em estudo experimental, observou-se que ratos submetidos à estimulação elétrica do nervo cavernoso, apresentavam aumento da NOSn, dando início à ereção e que posteriormente, em coordenação com a NOSe, ocorria a manutenção da ereção, concluindo que a NOSn é importante para ambas iniciação e manutenção da ereção peniana (HURT *et al.*, 2012).

Outros componentes importantes para a manutenção da ereção peniana são as células da musculatura lisa do CC, envolvidas no aumento da pressão intracavernosa (PIC) (GOLDSTEIN *et al.*, 1982). A porcentagem média da musculatura lisa trabecular de pacientes normais varia entre 42 e 50%. Em pacientes vasculogenicamente impotentes foi observada uma diminuição da

musculatura entre 28 e 35% (NEHRA *et al.*, 1996). Em estudo clínico comparando pacientes com DE grave, com e sem deficiência arterial, e cadáveres presumidos para terem sido potentes (controles), foram quantificadas as fibras musculares lisas do pênis destes pacientes e correlacionadas com deficiência arterial. Foi encontrado que a concentração média de musculatura lisa no grupo controle foi de 41,15%, no grupo DE grave sem insuficiência arterial foi de 27,24% e no grupo DE grave com deficiência arterial foi de 25,74%, ou seja, a proporção de musculatura lisa no grupo controle permaneceu dentro da normalidade, no entanto houve diminuição da quantidade de musculatura lisa nos pacientes com DE grave, sem interferência aparente do fluxo arterial, resultado provavelmente gerado por uma doença crônica ou fator de risco vascular como DM ou fumo (CLARO *et al.*, 2005). Por outro lado, em outro estudo quantidades similares de musculatura lisa e colágeno foram observadas no CC de pacientes com DE (COSTA *et al.*, 2006).

Existe uma associação entre ineficiência do retorno venoso com diminuição da musculatura lisa trabecular da área total de tecido erétil observada em pacientes impotentes, sugerindo o desenvolvimento de alterações fibróticas e pobre expansão trabecular que geram inadequada resistência no retorno venoso e então restringem a expansão do tecido erétil, impedindo a compressão das veias subtúnicas. Esta fibrose corpórea pode ocorrer devido a anormalidades da regulação da síntese e degradação de colágeno, secundariamente associadas a uma isquemia crônica local (NEHRA *et al.*, 1996).

As alterações fibróticas que ocorrem no pênis possivelmente envolvem mecanismos moleculares. Foi confirmado o aumento do fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1) em pacientes com DE de várias etiologias (CABRINI *et al.*, 2006). O TGF- β 1 é uma citocina que ativa fibroblastos e leva a fibrose. Seu aumento pode levar a uma deposição progressiva de MEC e fibrose tecidual (BORDER & NOBLE, 1994). A expressão de TGF- β 1 e seu ativador, trombospodina 1 (TSP1), foram encontradas aumentadas em pacientes com DE ou pós prostatectomia comparado a pacientes normais, podendo haver interação do ativador TSP1 com a via fibrótica de TGF- β 1 como um provável mecanismo associado com DE (CABRINI *et al.*, 2006). Sendo assim, estas mudanças de expressão proteica podem caracterizar o passo

inicial da via fibrótica relacionada com a DE em amostras de tecido peniano humano (CABRINI *et al.*, 2006).

As fibras elásticas são importantes para obter firmeza na ereção, podendo sua perda gerar diminuição da resistência na dilatação durante a ereção e assim diminuir a pressão. A diminuição nas fibras do sistema elástico no CC de pacientes com DE também pode ser observada, a qual pode levar à perda de capacidade elástica e prejudicar a ereção (COSTA *et al.*, 2006).

Outra questão bastante discutida, além da associação DE e estruturas do CC, é a relação idade e DE. A prevalência e severidade da DE aumentam com a idade (SHAMLOUL & GHANEM, 2013). Da mesma forma, sabe-se que existe uma relação de perda de função endotelial com a idade (TADDEI *et al.*, 1995). Assim, a associação entre idade e disfunção endotelial pode ser uma explicação para o aumento de prevalência de DE em homens mais velhos (GIULIANO, 2008).

Foi encontrada relação da idade com expressão aumentada de colágeno e diminuição de expressão de musculatura lisa em tecido cavernoso humano (LAGODA *et al.*, 2013). Semelhantemente, em ratos mais velhos notou-se diminuição da razão quantidade de músculo liso trabecular/tecido conjuntivo, onde o conteúdo de musculatura lisa em ratos jovens foi de 42,1%, semelhante a biopsias de homens normais (40 a 52%), e em ratos mais velhos foi 27% também semelhante a homens com disfunção veno-oclusiva (10 a 25%) (BAKIRCIOGLU *et al.*, 2001). Notou-se ainda diminuição na expressão e quantidade, respectivamente, de duas substâncias presentes nas células musculares lisas trabeculares e também envolvidas na regulação do NO (caveolina 1 e cavéola) nos animais mais velhos. Portanto, a diminuição destas substâncias e da razão musculatura lisa trabecular/colágeno podem contribuir para a DE com a idade (BAKIRCIOGLU *et al.*, 2001). Ainda neste sentido, a diminuição das atividades da NOSn e NOSe também estão associadas com prejuízo da função erétil relacionada com a idade, provavelmente pelo envolvimento do estresse oxidativo (ANDERSSON, 2003).

O fator idade tem ainda significativa relação endocrinológica com a DE. A testosterona tem importante função na atividade da NOS, por exemplo

(MILLS *et al.*, 1996), e sua deficiência está fortemente associada com o avanço da idade (TRAISH *et al.*, 2011).

1.2.1 Testosterona x Ereção

A deficiência de testosterona (DT), ou hipogonadismo, é altamente prevalente e está associada com a idade e com comorbidades médicas comuns como obesidade, diabetes mellitus 2 (DM2) e hipertensão (TRAISH *et al.*, 2011), as quais também estão relacionadas com DE. Fadiga, diminuição de libido, estado negativo de humor e a própria DE são sintomas clínicos de DT (ANDERSSON, 2003), sendo a disfunção sexual o sintoma mais específico de hipogonadismo de início tardio em homens de idade avançada (Wu *et al.*, 2010). Segundo Wu e colaboradores (2010), a DT pode ser identificada por sintomas de diminuição da frequência de ereção matinal, diminuição de pensamentos sexuais e DE, combinados com baixos níveis de T total e livre.

A testosterona está amplamente envolvida na função erétil. Exerce efeitos centrais e periféricos, atuando sobre o sistema Nervoso Central (SNC), neurônios motores espinhais e na região genital. Centralmente atua na liberação de neurotransmissores como o NO, e periféricamente modula componentes envolvidos na função erétil como estrutura, função e inervação das células musculares lisas trabeculares, função endotelial dos vasos penianos e propriedades fibroelásticas dos CC. Parte da resposta central da testosterona é mediada através de efeitos na libido e desejo sexual (GURBUZ *et al.*, 2008; ISIDORI *et al.*, 2014). A revisão de Traish e Guay (2006), mostra a participação dos androgênios na regulação de componentes celulares e em várias vias de sinalização do CC, como na expressão e atividade da NOS, fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), enzima que metaboliza GMPc (estimulado pelo NO para o relaxamento da musculatura lisa) (LUE, 2000), e receptores α adrenérgicos. Estes hormônios também estão envolvidos na regulação do crescimento celular da musculatura lisa e sua resposta a vasodilatadores, do metabolismo do tecido conjuntivo e deposição de MEC, da diferenciação de células progenitoras do estroma vascular em linhagens miogênicas e adipogênicas e manutenção da estrutura e função neural (TRAISH & GUAY, 2006; GURBUZ *et al.*, 2008; TRAISH, 2009). Alterações nestas vias podem

levar a falha no preenchimento de sangue do pênis e redução do fluxo sanguíneo resultando em aumento do retorno venoso e prejuízo do mecanismo de veno-oclusão, assim contribuindo para a DE (TRAISH *et al.*, 1999; TRAISH & GUAY, 2006; Traish, 2009).

Tanto a experimentação animal quanto a pesquisa humana indicam relação entre DT e DE, principalmente no que se refere à estrutura do CC. Em coelhos, ambas as castrações médica (agonistas LHRH), e cirúrgica (orquiectomia) diminuíram conteúdo, espessura e organização da musculatura lisa do CC com aumento de tecido conjuntivo, sugerindo a ocorrência de morte celular programada (apoptose) desse tecido muscular. A PIC, parâmetro de avaliação da resposta erétil, também foi prejudicada, porém não houve alteração na via do NO devido à ablação androgênica (TRAISH *et al.*, 2003). Também em coelhos, a ablação reduziu a PIC, a densidade receptores adrenérgicos- $\alpha 1$ e conteúdo de musculatura lisa significativamente, e a Terapia de Reposição com Testosterona (TRT) restaurou estes parâmetros a níveis normais (TRAISH *et al.*, 1999). Ainda nesta espécie, Traish e colaboradores (2005) observaram que a privação androgênica gerou um acúmulo de células adiposas na região subtúnica do CC acompanhado de reduzida resposta erétil (PIC), sugerindo uma possível função dos androgênios na modulação da diferenciação das células progenitoras do estroma em linhagem miogênica e no deslocamento dessa diferenciação para a linhagem adipogênica quando na ausência destes hormônios. A hipótese de que os androgênios inibem a diferenciação das células progenitoras do estroma em adipócitos e promovem diferenciação em musculatura lisa já havia sido anteriormente postulada em estudos *in vitro* (BHASIN *et al.*, 2003).

Em ratos, assim como em coelhos, a ablação androgênica promove alterações estruturais no CC, como por exemplo, no conteúdo de musculatura lisa, e TRT é capaz de reverter estas mudanças morfológicas (ROGERS *et al.*, 2003; GURBUZ *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2012). No homem, a ablação na forma de castração médica ou cirúrgica diminui a libido e a atividade sexual, prejudicando a função erétil (ROSSEAU, 1988). A TRT para homens hipogonádicos com DE é conhecida na restauração da função erétil e desejo sexual, principalmente em homens jovens e saudáveis (TRAISH & GUAY, 2006). Pacientes hipogonádicos (com baixos níveis de testosterona total e

livre) avaliados com DE e recebendo TRT foram avaliados quanto ao impacto da suplementação de testosterona na função erétil e satisfação sexual em 1, 3 e 6 meses após tratamento. A função erétil após 1 mês de TRT melhorou mas não foi sustentada nos meses restantes, podendo a etiologia da DE não ser endócrina mas talvez psicogênica. A libido aumentou após a TRT e se manteve em todo período de tratamento, resultado já esperado uma vez que a libido é dependente de um adequado meio hormonal (MULHALL *et al.*, 2004). Contudo ainda permanece questionável a melhora da função erétil com o uso de suplementação de T. Rhoden e colaboradores (2002a) avaliaram a relação entre variação nos níveis de testosterona de 1.071 homens (com idade média de 60,7 anos) na função erétil e não encontraram relação de DE com níveis de testosterona total, mas sim com a idade. A testosterona não mostrou correlação com a idade. Meses mais tarde, Rhoden e colaboradores (2002b), novamente não observaram correlação de DE ou grau de DE com níveis séricos de testosterona total em homens normais, todavia notaram que a frequência da ocorrência de DE aumentou com a idade, corroborando assim com a literatura onde a relação DE e androgênios é bastante controversa.

A relação da idade e DE, e idade com declínio de testosterona muitas vezes vem justificar o significado da T na DE (GOOREN & SAAD, 2006). Segundo o estudo epidemiológico *Massachusetts Male Aging Study* (MMAS), em 2004, a taxa de incidência de deficiência androgênica foi de 12,3 por 1.000 pessoas/ano, e esta taxa aumentou significativamente com a idade. Pode-se esperar cerca de 481.000 novos casos de deficiência androgênica por ano em homens americanos entre 40-69 anos de idade (ARAUJO *et al.*, 2004).

Estudos animais também apontam associação entre idade e alterações que possam levar a DE. Com base em que a cessação do crescimento peniano do homem e do rato está relacionado com diminuição específica tecidual no número de receptores androgênicos (RA) no pênis, foram determinados os níveis de RNAm do RA no CC de pênis de ratos com 16, 19, 22, 27, 52 e 90 dias de idade. Os níveis de RNAm do RA diminuíram significativamente com a idade e permaneceram quase indetectáveis nos animais de 52 e 90 dias, com apenas uma baixa quantidade persistindo no pênis dos animais adultos (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 1991). Outro trabalho mostrou aumento na porcentagem de colágeno com a idade, particularmente a

quantidade dos subtipos III e IV, podendo ser um dos mecanismos pelo qual o processo de idade influencia na DE, isto é, o processo da idade pode facilitar a fibrose no CC e principalmente a deposição de colágeno tipo IV na membrana basal, contribuindo para uma menor distensão do pênis (LIN *et al.*, 2001). Este estudo ressalta ainda a importância das limitações na extrapolação de resultados em ratos para humanos uma vez que influências hormonais e bioquímicas podem ser diferentes (LIN *et al.*, 2001).

Na prática clínica, em pacientes com DE são administrados primeiramente os inibidores da PDE5 (PDE5-I), classe farmacológica utilizada para manter a ereção em homens com DE (GIULIANO, 2008), porém outros tipos de tratamento devem ser considerados em caso de falha destas substâncias. Muitos homens com falha na resposta aos PDE5-I parecem ter uma deficiência de testosterona, e a reposição desse hormônio acaba restaurando esta resposta (GOOREN & SAAD, 2006). A terapia de reposição hormonal e PDE5-I vêm sendo utilizados de forma isolada ou em terapia de combinação em diferentes casos de DE com hipogonadismo (ISIDORI *et al.*, 2014). A administração de testosterona provou melhorar a resposta aos PDE5-I com consequente melhora da função erétil, já que os PDE5-I se mostram inefetivos na deficiência androgênica (TRAISH & GUAY, 2006). Entretanto, na revisão de Isidori e colaboradores (2014), os PDE5-I aparecem sendo utilizados como tratamento possivelmente exclusivo para pacientes com DE e baixos níveis de testosterona uma vez que o desempenho sexual, a qual melhora com os PDE5-I, está relacionada com consequente aumento dos níveis de testosterona circulantes, podendo então o TRT não se fazer necessário (ISIDORI *et al.*, 2014). Janjic e colaboradores (2012) observaram que a testosterona sérica aumentou transitoriamente em ratos que receberam dose única de Sildenafil (fármaco PDE5-I) após 1 e 2 horas de tratamento, resultado significativo considerando o efeito positivo do hormônio na atividade sexual (JANJIC *et al.*, 2012).

Contudo, apesar de todas as observações supracitadas, a relação dos androgênios com NO, fibras nervosas, PDE5 e até mesmo com DE ainda é encontrada de forma bastante contraditória (ISIDORI *et al.*, 2014). A DT e o desejo sexual são bastante discutidos. Em homens com hipogonadismo primário (falha testicular na produção de testosterona) (TRAISH & GUAY,

2006), a ereção não é alterada quando em resposta a estimulação visual, mostrando que o androgênio não é essencial à ereção (BANCROFT & WU, 1983). Ereções noturnas se mostram dependentes de androgênio, porém ereções induzidas sexualmente não, ou seja, outras vias não dependentes de androgênios podem estar envolvidas neste tipo de ereção (TRAISH & GUAY, 2006; GURBUZ *et al.*, 2008). Pacientes que fazem o uso de agonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) no tratamento da hiperplasia prostática benigna (HPB) ou câncer de próstata (CaP), e consequentemente têm significante redução dos níveis de testosterona até mesmo em níveis castrados mostram efeito importante na redução da função erétil, atividade sexual e ereções noturnas, porém muitos pacientes mantêm ou reduzem fracamente a libido (TRAISH & GUAY, 2006).

Uma possível explicação para a variação encontrada nos níveis androgênicos relacionada com a ereção e o desejo sexual é a produção de precursores da síntese de testosterona os quais mantêm alguma função sexual (TRAISH & GUAY, 2006). Isidori e colaboradores (2014) revisaram trabalhos que sugeriram uma dependência androgênica da função erétil mantida em valores limites muito abaixo da que é requerida para manter a função de outros órgãos alvos. Especula-se que homens normais tenham androgênios mais que suficiente para uma atividade sexual normal (ISIDORI *et al.*, 2014). Ratos adultos também mostram níveis de testosterona possivelmente em excesso do requerido para manter a função erétil (MILLS *et al.*, 1992).

Evidências apontam níveis reduzidos de testosterona livre, ou bioativa, como principal ligação entre DE e hipogonadismo. Porém, não somente a testosterona mostra papel significativo na função erétil, mas observações revisadas de estudos em humanos e animais mostram outros hormônios com importante participação, como a diidrotestosterona (DHT). Testosterona, DHT e intermediários da síntese de testosterona são importantes no desenvolvimento e crescimento do pênis (TRAISH & GUAY, 2006). Testes realizados para avaliar a ultraestrutura do pênis de ratos submetidos à castração ou administração de finasterida, inibidor da enzima que converte testosterona em DHT, sugeriram que ambos os hormônios são importantes para a manutenção do CC e estrutura normal da túnica albugínea, todavia agem de forma diferente e independente no CC (SHEN *et al.*, 2003).

Portanto, pode-se resumir que níveis séricos de testosterona apresentam-se bastante relacionados com o processo de ereção, sejam a níveis fisiológicos como na TRT, subfisiológicos como na castração ou até mesmo suprafisiológicos. Pressupõe-se que, no estado hipogonádico ou subfisiológico de testosterona, alterações de determinadas vias podem ocorrer levando ou auxiliando no surgimento da DE.

1.3 HIPOGONADISMO

1.3.1 Síntese e regulação de testosterona

A regulação fisiológica da síntese de T se dá através da secreção pulsátil do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, o qual estimula a hipófise a secretar as gonadotrofinas Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), que consequentemente também são produzidos em saltos e encontram-se em maior concentração pela manhã e com diminuição ao longo do dia. O LH estimula um grupo de células intersticiais, as células de Leydig, a produzir testosterona e o FSH estimula a espermatogênese e a função das células de Sertoli, as quais auxiliam na manutenção da espermatogênese. Em um mecanismo de autoregulação, a testosterona inibe o hipotálamo a secretar GnRH em frequência e amplitude, e inibe a hipófise a secretar LH. O LH pode ser inibido ainda pelo estradiol. As células de Sertoli também secretam uma glicoproteína, a Inibina B, considerada o principal regulador inibitório de FSH em adultos (DANDONA & ROSENBERG, 2010; PANTALONE & FAIMAN, 2012; REY *et al.*, 2013).

No sangue, a T circulante se encontra em diferentes frações: ligada fortemente à globulina de ligação de hormônios sexuais (SHBG, do inglês *sex hormone-binding globulin*) em aprox. 60%, fracamente ligada à albumina em aprox. 38% e em média de 1 a 2% livre no sangue. Estas três frações juntas representam a T total, e a soma das frações de T livre e ligada à albumina representa a T biodisponível, ou disponível para ação biológica (DANDONA & ROSENBERG, 2010; PANTALONE & FAIMAN, 2012). A porcentagem das frações de T varia amplamente, tanto fisiologicamente entre indivíduos quanto por fatores que alterem as concentrações de SHBG e albumina, afetando

assim os níveis séricos de T (PANTALONE & FAIMAN, 2012; PADUCH *et al.*, 2014).

1.3.2 Definição

O declínio dos níveis séricos de T, ou deficiência androgênica, é considerado causador da síndrome denominada hipogonadismo (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY ON MALE HYPOGONADISM, 2014). Não há um consenso exato sobre a terminologia para descrever este evento, por isso vários termos têm sido propostos (DANDONA & ROSENBERG, 2010; LEE, 2014).

- PADAM (Deficiência Androgênica Parcial no Envelhecimento Masculino)

- ADAM (declínio androgênico no envelhecimento masculino)
- Climatério masculino
- Viropausa
- Hipogonadismo relativo
- Hipoandrogenemia
- Menopausa masculina
- Andropausa
- Hipogonadismo de início tardio
- Síndrome da deficiência de testosterona
- Síndrome da deficiência androgênica

O hipogonadismo é uma síndrome clínica e bioquímica caracterizada por uma deficiência nos níveis séricos de androgênos que pode diminuir o interesse sexual, a qualidade das ereções e a qualidade de vida (MORALES *et al.*, 2004). Segundo a revisão de Rey e colab. (2013) uma melhor definição para hipogonadismo seria “comprometimento da secreção hormonal pelas células de Sertoli e/ou células de Leydig e/ou desordem da espermatogênese, quando comparado com o que é comparado para a idade”, ou seja, neste termo são considerados os compartimentos intersticial e tubular através da avaliação da atividade das células de Leydig e espermatogênese ou função das células de Sertoli, respectivamente.

1.3.3 Classificação

O hipogonadismo é normalmente classificado de acordo com o nível originalmente afetado no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, como primário e secundário. O hipogonadismo testicular, primário, ou hipergonadotrófico é aquele em que a falha tem origem nos testículos e é caracterizado por níveis baixos de T com aumento dos níveis de LH e FSH, uma vez que não há a retroalimentação negativa da T no eixo. No secundário, ou hipogonadismo hipogonadotrófico, ocorre falha testicular devido a alterações no pulso do GnRH ou na hipófise, gerando níveis baixos de T e níveis de LH e FSH podendo estar baixos ou normais. Existe ainda o hipogonadismo misto, ou combinado, que ocorre quando há comprometimento central (hipotálamo-hipófise) e falha testicular concomitantemente, porém esse termo não é muito utilizado na prática clínica e normalmente acaba entrando na classificação de hipogonadismo secundário (DANDONA & ROSENBERG, 2010; REY *et al.*, 2013)

Seis centros europeus avaliaram o quanto as diferentes formas de hipogonadismo podem ser distinguidas entre homens com 40 a 79 anos de idade através de características clínicas e fatores de risco específicos. O hipogonadismo primário foi minoria entre os participantes, cerca de 2%, e se mostrou fortemente associado com a idade, podendo ser considerado a forma genuína de hipogonadismo de início tardio. O hipogonadismo secundário foi o mais prevalente entre os indivíduos e mostrou relação com obesidade independente da idade, assim provavelmente não sendo de início tardio. Por fim, o hipogonadismo compensado (misto) teve associação clara com a idade em homens entre 70-79 anos e associação predominante com sintomas físicos, provavelmente pela relação do LH na força muscular. O LH elevado foi sugerido como achado clínico significativo associado com sintomas clínicos, representando assim um subgrupo genuíno de hipogonadismo de início tardio. Portanto, medidas hormonais, fatores de risco específicos (idade, obesidade) e sintomas associados (físicos e sexuais) podem diferenciar os tipos de hipogonadismo (TAJAR *et al.*, 2010).

Pode-se ainda classificar esta síndrome de acordo com a população de células testiculares inicialmente debilitadas e o período da vida em que a

função das gônadas começa a falhar (fetal, infância, puberdade ou adulto). Pode-se ter hipogonadismo completo com comprometimento concomitante de todas as populações celulares testiculares (Leydig, Sertoli, germinativa), ou hipogonadismo dissociado quando somente uma população de células ou só um compartimento testicular (túbulos seminíferos ou tecido intersticial) forem principalmente afetadas (REY *et al.*, 2013).

1.3.4 Causas

Existe uma infinidade de causas para o hipogonadismo que podem ser adquiridas ou congênitas, permanentes ou transitórias, de origem primária ou secundária. O hipogonadismo primário pode ser causado por condições genéticas e de desenvolvimento (ex.: receptor androgênico - RA), quimioterapia, defeitos congênitos, infarto ou trauma testicular, caxumba, hemocromatose, medicamentos que alterem a síntese de T (ex.: cetaconazol), aumento da temperatura do ambiente testicular (ex.: varicocele), entre outros. No hipogonadismo secundário têm-se desordens congênitas como mutações genéticas associadas com deficiências do hormônio da hipófise, deficiência ou mutação no receptor GnRH, desordens adquiridas que suprimem gonadotrofinas como uso de determinadas drogas (ex.: opióides), obesidade e condições relacionadas (DM2, resistência à insulina, apnéia do sono), idade, hemocromatose, hiperprolactinemia, excesso de estrogênio, vírus da imunodeficiência humana, anorexia nervosa, abuso de esteroides anabólicos, abuso de álcool, condições médicas crônicas (falha renal, cirrose...), hipotireoidismo primário crônico severo e desordens adquiridas que danificam as gonadotrofinas como lesão metastática, cisto hipofisário, lesão infiltrativa, trauma, radiação, cirurgia...entre outras. No hipogonadismo misto, o abuso de álcool, idade, infecções crônicas, medicações, hemocromatose e doenças sistêmicas como falha hepática podem levar a esta condição (DANDONA & ROSENBERG, 2010; PANTALONE & FAIMAN, 2012).

1.3.5 Efeitos da testosterona e sua ausência

Os androgênios são extremamente importantes para o desenvolvimento e manutenção da reprodução e vida sexual no homem. (EUROPEAN

ASSOCIATION OF UROLOGY ON MALE HYPOGONADISM, 2014). No desenvolvimento fetal, os androgênios iniciam a diferenciação das estruturas genitais em forma e tamanho. Na infância, ocorre um estado fisiológico de secreção diminuída de gonadotrofinas e androgênios, caracterizando esta fase como um estado hipogonádico. Na puberdade, ocorre aumento em amplitude e frequência do pulso de gonadotrofinas, e assim consequente aumento de T circulante, além da maturação das células relacionadas com a reprodução (REY *et al.*, 2013). Fisiologicamente, os efeitos da T compõem a manutenção dos tecidos reprodutores, estimulação da espermatogênese, estimulação e manutenção da função sexual, aumento do peso corporal e retenção de nitrogênio, aumento da massa magra corporal, manutenção da massa óssea, estimulação da eritropoiese, promoção da produção de sebo e crescimento dos pêlos corporais (DANDONA & ROSENBERG, 2010).

Segundo as diretrizes da Associação de Urologia Européia (EAU, do inglês *European Association of Urology*), são considerados sinais e sintomas de deficiência androgênica: atraso na puberdade, testículos pequenos, fator de infertilidade masculina, diminuição dos pêlos corporais, ginecomastia, diminuição de massa magra e força muscular, obesidade visceral, diminuição da densidade mineral óssea, redução do desejo e atividade sexual, disfunção erétil, diminuição de ereções noturnas, alterações de humor, fadiga, síndrome metabólica, resistência à insulina, DM2 e diminuição da função cognitiva.

O estudo no envelhecimento masculino europeu (EMAS, do inglês *European Male Aging Study*) conduziu 3369 participantes com idade entre 40 a 79 anos para caracterizar sintomas clínicos associados com baixos níveis de T. Nove sintomas foram relacionados com baixos níveis de T total e livre, classificados em sintomas sexuais (diminuição da frequência de ereções matinais, pensamentos sexuais e DE), sintomas físicos (dificuldades em atividades vigorosas, levantamento de peso, corridas com mais de 1 km) e fracamente relacionados com sintomas psicológicos (perda de energia, tristeza/desânimo e fadiga) (WU *et al.*, 2010). Neste estudo foram estabelecidos critérios mínimos para o diagnóstico de hipogonadismo de início tardio em homens de idade, sendo estes a presença de pelo menos três sintomas sexuais com níveis de T total menor que 11nmol/L e T livre menor que 220 nmol/L.

Considerando a definição para Deficiência Androgênica Sintomática (DAS) segundo o Guia de Prática Clínica da Sociedade Endócrina (BHASIN *et al.*, 2006) como “sintomas de baixos níveis de T, divididos em dois conjuntos: mais específicos (ou sugestivos) como libido, DE, osteoporose/fratura osteoporótica e menos específicos (ou associados) como letargia, distúrbios do sono, humor depressivo e baixa performance física, usados juntamente com parâmetros bioquímicos”, Araujo e col. (2007) avaliaram a associação entre sintomas de deficiência androgênica e baixos níveis de T total e livre, e foram encontradas porcentagens relativas de baixo libido, DE e 2 ou mais sintomas não específicos elevados em homens com baixos níveis de T comparado aos normais. A presença de sintomas foi fortemente relacionada com os níveis de T em homens mais velhos (ARAUJO *et al.*, 2007). A ocorrência de diminuição da habilidade para realizar o ato sexual, do desejo sexual ou libido, exaustão física e declínio no bem-estar geral são encontrados aumentados em homens hipogonádicos (MULLIGAN, *et al.*, 2006; LEJEUNE *et al.*, 2013).

No hipogonadismo há diminuição de massa magra (ou livre de gordura) e aumenta a massa gorda. A reposição fisiológica de T reverte esses efeitos em homens hipogonádicos jovens e saudáveis com aumento de força muscular, e em doses suprafisiológicas há aumento de massa magra, tamanho muscular, força e diminuição de massa gorda, efeitos potencializados com treino de força muscular concomitante. A reposição hormonal em homens mais velhos também mostra o efeito de troca de massa gorda para magra. Administração de T para homens idosos com baixos níveis de T estimula síntese muscular protéica, além de aumento na expressão de RA na musculatura esquelética (FERRANDO *et al.*, 2002). Além disso, a suplementação androgênica em pacientes com doenças crônicas promove melhora muscular nestes indivíduos (BHASIN *et al.*, 2003).

Muitas destes efeitos da T na musculatura se mostram dependentes de concentrações dos níveis de T ou dose-resposta dependente de testosterona. Bhasin e colab. (2001) mostraram que diferentes níveis de T, através da administração de um agonista GnRH em diferentes doses, provocaram alterações dependentes de concentrações de T na musculatura, nos parâmetros do perfil lipídico, sanguíneo e metabólico. A massa magra aumentou significativamente com crescentes doses de T. Força de pressão e

potência da perna, volume muscular do quadríceps e coxa, hemoglobina (Hb) e IGF-1 correlacionaram positivamente com os níveis de T. HDL e massa gorda correlacionaram negativamente. Antígeno Prostático Específico (PSA, do inglês *Prostate-Specific Antigen*), função sexual, cognição espacial e visual e humor não foram alterados com os diferentes níveis do hormônio. Portanto, concluiu-se que as relações de diferentes processos dependentes de androgênios têm diferentes doses-resposta de T (BHASIN *et al.*, 2001).

Os mecanismos dos efeitos anabólicos da T podem estar relacionados com a síntese protéica muscular e aumento do tamanho da fibra (hipertrofia), além de outros efeitos (BHASIN *et al.*, 2003). Estudos mostraram que T e DHT regulam a diferenciação de células pluripotentes de origem mesenquimal, estimulando sua diferenciação na linhagem miogênica (observado pelo aumento de marcadores miogênicos), enquanto inibem a diferenciação adipogênica (notados através da diminuição da expressão de fatores de diferenciação desta via). Estes efeitos foram mediados através de mecanismos dependentes do RA e apresentaram uma relação dose-dependente destes androgênios. Esta hipótese de regulação pode ser uma explicação, em parte, para a ação destes hormônios na diminuição de massa livre de gordura e aumento de massa magra, porém, não exclui outros efeitos da T na indução de miogênese (como aumento de síntese protéica). Apesar de ambos os hormônios mostrarem influência na regulação destas vias, a DHT apresentou maior potência do que a T (SINGH *et al.*, 2003).

Os níveis de T também se correlacionam com depressão e até mesmo com prejuízo na memória. A ablação androgênica diminuiu a memória, tanto de curta quanto de longa duração, em ratos tratados com estreptozotocina (droga utilizada como modelo esporádico de doença de Alzheimer), enquanto que a TRT atenuou o prejuízo da castração (SEYEDREZA *et al.*, 2012). A TRT pode ainda ter efeito antidepressivo em pacientes hipogonádicos (ZARROUF, F. A . *et al.*, 2009).

1.3.6 Prevalência, incidência, mortalidade e fatores associados

A prevalência de hipogonadismo varia entre os estudos de acordo com o tipo de estudo, os critérios utilizados para definir este estado e com a população

examinada. Contudo, geralmente é observado que a prevalência é alta, aumenta com a idade e não mostra diferenças entre raças e etnia (MULLIGAN, *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2004; DANDONA & ROSENBERG, 2010; PADUCH *et al.*, 2014).

Em 2004, foi conduzido o estudo do envelhecimento masculino em Massachusetts (MMAS, do inglês *Massachusetts male aging study*) (ARAUJO *et al.*, 2004), uma coorte em que foram avaliados homens de meia idade e idade avançada (40 a 70 anos) a definição utilizada para a síndrome de deficiência androgênica foi a presença de sinais e sintomas somados a medidas de T total e T livre calculada, e não somente dados bioquímicos. Foi encontrada uma prevalência entre 6 e 12% da síndrome, estimando 2,4 milhões de homens com deficiência androgênica, com idade entre 40-69 anos, na população dos EUA, e podendo esperar aproximadamente 481 novos casos por ano nessa população. Mais tarde (2006), entre 2650 homens com 45 anos ou mais e que visitam as práticas de atenção primária nos EUA, a prevalência de hipogonadismo encontrada foi de 38,7%, e homens com 65 anos ou mais tiveram 1,2 vezes mais probabilidade de apresentar hipogonadismo do que menores de 65 anos. Todavia, neste estudo o hipogonadismo foi definido apenas com parâmetro de dosagem hormonal (T total <300ng/dL) (MULLIGAN, T. *et al.*, 2006) talvez explicando a grande diferença nos valores encontrados. No EMAS, utilizando os critérios de no mínimo 3 sintomas sexuais somados a parâmetros bioquímicos para avaliação de hipogonadismo, a prevalência aumentou com a idade e foi de 2,1%, bem menor do que quando o diagnóstico é apenas bioquímico, portanto ressaltando a importância de não se usar somente medidas bioquímicas (WU *et al.*, 2010). A prevalência de hipogonadismo de início tardio se torna menor quando utilizados os critérios de diagnóstico estritos para esta condição e não os inespecíficos uma vez que está frequentemente associado com achados não específicos (idade, diminuição de massa óssea, muscular e força, função física e mudanças metabólicas como obesidade abdominal, síndrome metabólica, DM2 e função sexual) (HUHTANIEMIL, 2014).

A prevalência da DAS, isto é, considerando a análise bioquímica (T total e livre) além de sintomas específicos e não específicos, entre 1.475 homens, foi estimada em 5,6%. Assim pôde-se estimar 6,5 milhões de americanos entre

30 e 79 anos com esta deficiência para 2025, aumento de 38% a partir do ano 2000. A prevalência aumentou significativamente com a idade e em relação aos sintomas, foi de 12% para baixa libido, 16% para DE, 1% para fratura/osteoporose e 20% para sintomas não específicos (ARAUJO *et al.*, 2007). Em um estudo com brasileiros, a prevalência do declínio de T foi de 20% e também declinou com a idade (NARDOZZA *et al.*, 2011).

Portanto, o hipogonadismo é uma condição comum, altamente prevalente com a idade e que tende a crescer nos próximos anos. Além da idade, sua prevalência está relacionada com obesidade, DM2, síndrome metabólica, entre outras condições e fatores, porém ainda não está bem estabelecida a questão de quem é causa e quem é consequência (MULLIGAN, T. *et al.*, 2006; DANDONA & ROSENBERG, 2010; MONROE & DOBS, 2013; LEE, 2014; HUHTANIEMIL, 2014). Estudos apontam uma maior frequência de condições como índice de massa corporal (IMC), hipertensão, hiperlipidemia, diabetes/resistência à insulina, asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica, aumento de lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês Low Density Lipoproteins) e diminuição de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês High Density Lipoproteins) em homens hipogonádicos quando comparados a eugonádicos (MULLIGAN, T. *et al.*, 2003; GURBUZ *et al.*, 2008; MONROE & DOBS, 2013). Além da T, outros hormônios sexuais (adrenais) e seus metabólitos como deidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de deidroepiandrosterona (DHEAS), androstenediona e androstenediol mostraram associação com alguns fatores, onde estes hormônios diminuíram com a idade e apresentaram clara associação inversa com IMC (FIELD *et al.*, 1994).

Phillips e colab. (2003) avaliaram a relação entre hormônios sexuais, insulina, variáveis de adiposidade como IMC, tecido adiposo total (TAT), tecido adiposo subcutâneo (TASC), tecido adiposo visceral (TAV), relação cintura-quadril (RCQ) e circunferência da cintura (C), e fatores de risco para infarto do miocárdio (IM) como idade, colesterol, triglicerídeos (TG), HDL, glicose e insulina em 80 homens saudáveis. O TAV foi a variável de adiposidade que mais se relacionou aos fatores de risco para IM, aos hormônios sexuais e à insulina, porém a relação foi mais forte com fatores de risco para IM, podendo ser o TAV a principal ligação entre estes fatores para formar a constelação de condições que ocorre no IM (intolerância à glicose, hiperinsulinemia,

hiperlipidemia e hipertensão). Mostrou-se ainda que alterações dos hormônios sexuais possa ser a base para o dano insulínico, bem como para o acúmulo de TAV (PHILLIPS *et al.*, 2003).

No Brasil, a obesidade e adiposidade central exibiram forte influência na associação de pacientes com DM2 e níveis subnormais de T total e livre (RHODEN *et al.*, 2005). A prevalência de homens com DM2 e baixos níveis de T apresenta-se alta e tende a aumentar com a idade, provavelmente porque em indivíduos mais jovens a maioria dos pacientes diabéticos é DM1. Fatores como idade, IMC, renda e neuropatia foram indicados como fatores de risco independentes para baixos níveis de T. Sendo assim, recomenda-se rastreamento em todos pacientes DM2 para níveis androgênicos nos serviços de saúde de referência (AL HAYEK *et al.*, 2013).

Além da alta prevalência, níveis séricos subnormais de T também apresentam alto risco de mortalidade quando comparado a homens com níveis normais (SHORES *et al.*, 2006). Um estudo observacional em homens de meia idade e idade avançada com baixos níveis de T, mostrou alta morbidade crônica médica (diabetes em 38%, DE em 36% e doença cardíaca coronariana em 21%) e em homens recebendo TRT encontrou correlação entre mortalidade com menores níveis de T e redução do risco de mortalidade. Não foram encontradas diferenças no tratamento para idade, diabetes ou doença cardíaca coronariana. Contudo, a redução de mortalidade pelo tratamento com T foi mais significativa em diabéticos, não cardíacos e indivíduos mais jovens (<60 anos) (SHORES *et al.*, 2012).

1.3.7 Coleta e diagnóstico

Os estudos que analisam a condição de hipogonadismo vêm considerando como diagnóstico alguns sintomas, específicos e não específicos, e não somente parâmetros bioquímicos como a dosagem de T total (BHASIN *et al.*, 2006; GURBUZ *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2010; HUHTANIEMI, 2014). Recomenda-se a presença de pelo menos 3 sintomas sexuais somados a níveis de T total e T livre, porém deve se levar em conta a situação da saúde geral do indivíduo (WU *et al.*, 2010). A inespecificidade dos sintomas relacionados com baixos níveis de T mostra a importância de realizar

este tipo de diagnóstico, já que é mostrada uma fraca associação entre níveis de T e sintomas na população ((WU *et al.*, 2010; DANDONA & ROSENBERG, 2010). O resultado da associação entre níveis de T total, comparado aos resultados da T livre, com sintomas relacionados a baixos níveis desses hormônios mostra que a T total pode ser utilizada como o primeiro critério bioquímico no diagnóstico no hipogonadismo de início tardio. A avaliação de T livre pode ser útil em pacientes *borderline*, ou seja, quando a T total está no limite entre valores eugonádicos e hipogonádicos, sendo assim duvidosos (WU *et al.*, 2010). A medida de T total pode ser suficiente para identificar baixos níveis de T, exceto em condições que alterem a concentração de SHBG, por exemplo, como a idade. Homens de idade mais elevada são suscetíveis a muitas condições que dividem os mesmos sintomas similares ao hipogonadismo, podendo mascarar hipogonadismo oculto (MULLIGAN, T. *et al.*, 2006).

Não há um consenso geral que defina deficiência de T. Existe uma ampla variação na definição dos valores limítrofes de T, portanto é importante levar em conta a diferença nos valores de referência entre os laboratórios (DANDONA & ROSENBERG, 2010; PANTALONE & FAIMAN, 2012; PADUCH *et al.*, 2014). Em homens com 45 anos ou mais e que visitavam as práticas de atenção primária nos EUA foram encontrados valores de T total entre 50 a 1573ng/dL (MULLIGAN *et al.*, 2006) mostrando a ampla variação existente em uma população. O uso inflexível do ponto de corte de T (300ng/dL) pode levar a um tratamento desnecessário em homens assintomáticos e um subtratamento para quem apresenta sinais e sintomas (PADUCH *et al.*, 2014). Segundo os estudos revisados por Pantalone e Faiman em 2012, valores de T total podem ser considerados baixos quando menores que 200-250 ng/dL, enquanto que valores entre 250-350ng/dL podem ser considerados *borderline* (PANTALONE & FAIMAN, 2012). As diretrizes médicas da Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos, em 2002, consideraram a variação de T total entre 200-400ng/dL como potencialmente hipogonádicos (PETAK *et al.*, 2002).

A concentração de T pode variar devido a muitos fatores como atividade sexual, horário da coleta, ingestão/dieta (TG, glicose, medicações), variação diurna, variação interpessoal, concentração de SHBG, estado de saúde, entre

outros (PADUCH *et al.*, 2014). A T ligada a SHBG tem ampla variação já que muitos fatores alteram sua concentração, como por exemplo a idade. Sendo assim, como esta T não é biodisponível deve-se dar atenção aos valores desta proteína em relação aos valores de T (PADUCH *et al.*, 2014). Além dos fatores relacionados ao indivíduo que podem alterar a mensuração de T, existem variáveis no método/ensaio que podem dificultar esta avaliação, como a padronização na calibração de T, diferenças nos métodos de mensuração (imunoensaio, cromatografia) e até diferenças observadas quando utilizado o mesmo método, dificultando assim o estabelecimento de uma faixa normal nos valores de T entre os laboratórios. Recomenda-se que no diagnóstico de níveis baixos de T total considere-se o uso de um ensaio com variação normal e local (BHASIN *et al.*, 2006). Devido a todas as considerações mencionadas, seria aconselhável a criação de uma faixa normal utilizando pacientes saudáveis em variadas idades com funções reprodutivas e sexuais normais. Também a calibração de metodologias e faixas de referência de T livre deveria ser baseada na população. A T total e SHBG podem ter melhor acurácia se os cálculos de T biodisponível e livre forem realizados (PADUCH *et al.*, 2014).

As investigações bioquímicas incluem T total e biodisponível ou T livre calculada, a prolactina devendo ser considerada quando o hipogonadismo for documentado (MORALES *et al.*, 2004). Outras medidas podem se fazer necessárias, como LH, FSH, SHBG, albumina, TSH, T4, ferritina e avaliação completa da hipófise, sempre dependendo do quadro encontrado no paciente (GURBUZ *et al.*, 2008; PANTALONE & FAIMAN, 2012). A T livre pode auxiliar no diagnóstico de hipogonadismo principalmente quando o ensaio falhar (PADUCH *et al.*, 2014). As dosagens de LH e FSH ajudam a decifrar a etiologia do hipogonadismo (PANTALONE & FAIMAN, 2012). Devido à alta prevalência de pacientes DM2 com níveis subnormais de T, recomenda-se rastreamento em todos DM2 para níveis androgênicos nos serviços de saúde de referência para endocrinologistas (AL HAYEK *et al.*, 2013). Quando os níveis de T se apresentarem baixos é importante confirmar o resultado com segundo exame em laboratório confiável (PANTALONE & FAIMAN, 2012).

As amostras para análise hormonal devem ser coletadas próximo às 8h da manhã, sempre avaliando o estado de saúde na hora da coleta, pois

doenças agudas, tratamento com opióides, esteróides anabólicos ou corticosteroides podem alterar os níveis de T (PANTALONE & FAIMAN, 2012).

1.3.8 Tratamento

O objetivo da TRT é promover níveis normais (fisiológicos) de T com a melhor opção ou tipo de tratamento disponível (DANDONA & ROSENBERG, 2010). Membros de um grupo de especialistas representantes de sociedades americanas, europeias e internacionais que investigaram o hipogonadismo de início tardio recomendaram que a T total acima de 350ng/dl não requer tratamento, porém abaixo de 230ng/dL, apresentando sintomas, pode requerer. Se os níveis de T total estiverem entre 230-350ng/dL é recomendado que se repita a análise avaliando a SHBG concomitantemente para realização do cálculo de T livre ou mesmo dosando diretamente a T livre (WANG *et al.*, 2009).

O ideal seria iniciar a terapia com mudanças no estilo de vida e otimizar o tratamento de comorbidades antes da administração de T, principalmente em pacientes com sintomas não específicos devido a outras condições como obesidade, síndrome metabólica, depressão, diabetes ou outras doenças crônicas. É importante sempre informar os riscos e benefícios que o tratamento pode gerar mesmo que este assunto seja ainda bastante desconhecido (HUHTANIEMIL, 2014).

Existem evidências de benefícios do TRT na função erétil, desde ereções noturnas, desejo sexual até mesmo na própria relação sexual (GURBUZ *et al.*, 2008; LEJEUNE *et al.*, 2013). Além disso, TRT está associada com menor risco de mortalidade (SHORES *et al.*, 2012), estímulo de síntese protéica (FERRANDO *et al.*, 2002), melhora do perfil lipídico podendo reduzir os riscos de DCV (MONROE & DOBS, 2013) e até mesmo com a atenuação de prejuízo na memória (SEYEDREZA *et al.*, 2012). Por outro lado, há riscos no estímulo do crescimento da próstata e agravamento da hiperplasia benigna de próstata (LEE, 2014) ou não (LEJEUNE *et al.*, 2013), câncer de mama, alterações no fígado, policitemia, ginecomastia, atrofia testicular, exacerbação da apneia do sono, entre outros (LEE, 2014). A TRT pode estar contraindicada em situações como hematócrito elevado, estudos de função hepática anormal, sintomas do trato urinário e apneia do sono (ISIDORI *et al.*, 2005). Os pacientes

devem ser monitorados periodicamente para avaliações de função hepática, perfil lipídico de jejum, PSA, hematológicas, de humor e bem-estar, e cuidados com CaP ou câncer de mama, tanto antes do início da terapia como durante (GURBUZ *et al.*, 2008; LEE, 2014)

O tratamento farmacológico do hipogonadismo pode ocorrer através de diferentes formulações como injeções intramusculares, emplastro transdermal, gel transdermal, pastilhas bucais, pelete subcutâneo e cápsulas ou comprimidos de T oral (DANDONA & ROSENBERG, 2010). Pode ser ainda não farmacológico, através da promoção de saúde (ex.: exercícios, dieta...) e evitando o que poderia levar a um distúrbio hormonal (estresse, álcool, cigarro...) (LEE, 2014). Em casos de hipogonadismo e DE existem as opções de utilizar a TRT ou PDE5-I de forma isolada ou em terapia de combinação, ou seja, pacientes com hipogonadismo primário ou secundário, com significativa queda nos níveis de T e se jovens, podem receber TRT como tratamento de primeira linha e se necessário os PDE5-I adicionados. Não há grandes preocupações de segurança que limitem o uso de TRT em pacientes de meia-idade que se beneficiam do tratamento, não somente na vida sexual como no metabolismo, ossos e musculatura, contudo uma maior atenção deve-se dar em homens de idade avançada com risco cardiovascular onde a TRT pode produzir efeitos adversos e por isso o tratamento deve ser adaptado (ISIDORI *et al.*, 2014).

1.4 TERAPIAS DE PRIVAÇÃO ANDROGÊNICA

Ao contrário da TRT, existe a Terapia de Privação Androgênica (ADT, do inglês *Androgen Deprivation Therapy*), bastante utilizada no tratamento do câncer de próstata (CaP), em combinação ou não com outras formas de tratamento (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY ON PROSTATE CANCER, 2014) sendo considerada a terapêutica de primeira linha no tratamento de CaP metastático pela Sociedade Brasileira de Urologia (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA -SBU, 2011).

A ablação androgênica para tratamento do CaP foi reportado primeiramente por Huggins e Hodges em 1941 através de orquiectomia bilateral e administração de estrogênio (HUGGINS *et al.*, 1941). Desde então

outras formas de tratamento surgiram e continuam a ser estudadas a fim de encontrar o melhor método para levar a privação androgênica. Atualmente, a terapia pode ser alcançada por supressão da secreção de androgênios testiculares, através da castração médica ou cirúrgica, ou inibindo a ação dos androgênios circulantes ao nível do seu receptor utilizando compostos competidores conhecidos como antiandrogênios. Além disso, estes dois métodos podem ser combinados para conseguir o que é conhecido como completo (ou máximo ou total) bloqueio androgênico (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY ON PROSTATE CANCER, 2014). Segundo a SBU, a escolha entre castração médica (ou química), administração de agonistas ou antagonistas do GnRH deve ser individualizada (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA -SBU, 2011).

1.4.1 Castração cirúrgica ou orquiectomia bilateral

Este método leva a uma queda considerável nos níveis de testosterona e induz um estado de hipogonadismo, conhecido como "Nível de castração" (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY ON PROSTATE CANCER, 2014). É considerado como um procedimento simples e barato e quase sem complicações (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA - SBU, 2011). A redução dos níveis circulantes de T é imediata após a orquiectomia bilateral, onde níveis de castração são atingidos entre 3 e 12 horas após cirurgia (LIN *et al.*, 1994). Sua principal desvantagem é o seu efeito psicológico negativo, onde alguns homens consideram este procedimento uma agressão à sua masculinidade. Além disso, é irreversível e não permite um tratamento intermitente. Contudo ainda é considerada o "padrão ouro" para a ADT (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY ON PROSTATE CANCER, 2014).

1.4.2 Castração química ou médica utilizando agonistas e antagonistas

1.4.2.1 Agonistas do GnRH

São substâncias bastante semelhantes ao GnRH natural em estrutura e função, porém mais potentes. Inibem a produção do LH e consequentemente T

e DHT através de retroalimentação negativa. Entretanto, nos primeiros dias após sua administração causam aumento no LH e consequente aumento transitório de T e DHT, podendo gerar situações indesejadas bastante dolorosas e até mesmo perigosas com riscos de sequelas em pacientes com CaP (COOK & SHERIDAN, 2000). Portanto, é frequente a utilização concomitante de antiandrogenios para tentar minimizar estas sequelas, ou até mesmo para atingir máxima privação androgênica (Mc LEOD, 1993) uma vez que há uma pequena contribuição na produção androgênica proveniente da glândula adrenal (CHODAK, 2004) Todavia estas substâncias também podem levar a desagradáveis efeitos adversos (COOK & SHERIDAN, 2000).

1.4.2.2 Antagonistas do GnRH

Se ligam diretamente no receptor GnRH bloqueando a ação dos mediadores endógenos, suprimindo a produção de LH e consequentemente T e DHT (COOK & SHERIDAN, 2000). Da mesma forma que com os agonistas, os antagonista parecem levar os receptores GnRH da hipófise a uma hiporegulação e não meramente uma ocupação dos sítios (HALMOS *et al.*, 1996). Não causam a estimulação inicial de androgênios como os agonistas, prevenindo a piora temporária da doença e podendo evitar o uso de antiandrogenios. Porém, alguns problemas já observados foram falha na solubilidade, na potência e propriedades de liberação de histamina (COOK & SHERIDAN, 2000).

1.4.3 Avaliação dos diferentes processos de “castração”

A castração cirúrgica e o tratamento com antagonistas do GnRh mostram equivalência na supressão de T, com superioridade aos agonistas do GnRH (TIEVA *et al.*, 2003). Porém, este procedimento tem sido substituído, em grande parte, por castração medicamentosa com agonistas do GnRH pela melhor aceitação por pacientes e médicos (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA-SBU, 2011).

Na comparação do uso de agonistas com antagonistas do GnRH pode-se observar a superioridade dos antagonistas relacionada a vários processos como: ativação e manutenção dos níveis castrados, impedimento do aumento

de LH e T que são prejudiciais no tratamento do CaP. Com o uso de antagonistas evita-se efeitos adversos provenientes dos antiandrogenios (já que estes não se fazem necessários no tratamento com antagonistas), supressão mais rápida do PSA, melhor controle de marcadores ósseos e até mesmo na sobrevida global dos pacientes, efeitos estes normalmente associados ao mecanismo de ação dos antagonistas (TOMERA *et al.*, 2001; TIEVA *et al.*, 2003; KLOTZ *et al.*, 2014).

Atualmente dois antagonistas do GnRH estão disponíveis para utilização clínica: Abarelix e Degarelix (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA-SBU, 2011). Abarelix foi o primeiro antagonista estudado (BOCCON-GIBOD *et al.*, 2011) e já mostrava superioridade com rápida castração médica, sem aumento de T, e maior taxa de diminuição do PSA em comparação com os agonistas (TOMERA, K. *et al.*, 2001). Mas com o tempo, através da observação do seu perfil, foi mostrando diminuição no tempo de supressão e o aparecimento de reações alérgicas (BOCCON-GIBOD *et al.*, 2011).

O agente mais estudado da classe dos antagonistas é o Degarelix. Este fármaco vem mostrando superioridade tanto em relação aos agonistas (KLOTZ *et al.*, 2014) quanto sobre outros fármacos da sua própria classe, os antagonistas (BROQUA *et al.*, 2002). Em comparação a superagonistas (Leuprolida e Triptorelina), foi considerado um bloqueador mais efetivo dos receptores do GnRH com supressão de T rápida e sustentada, sendo o controle de T melhor tanto a curto quanto a longo prazo (PRINCIVALLE *et al.*, 2007). Avaliando eficácia e segurança destas terapias em cinco ensaios randomizados, Degarelix apresentou resultados superiores aos tratamentos com Leuprolida e Goserelina (agonistas GnRH) como na melhora da sobrevida livre de progressão do PSA, da sobrevida global, e de eventos adversos relacionados ao CaP (no trato urinário, ossos e articulações) (KLOTZ *et al.*, 2014).

O melhor desempenho de degarelix também ocorre quando comparado a outros antagonistas. Broqua e colaboradores (2002) descreveram o perfil farmacológico de Degarelix, em diferentes doses e vias de administração, comparando-o com Abarelix, Gabirelix, Cetrorelix e azalina B (antagonistas) *in vivo* e *in vitro*. Degarelix, formulado em veículo simples como manitol,

apresentou propriedades únicas de longa duração, em roedores e primatas, como absorção lenta do sítio de ação, ligação a proteínas plasmáticas e baixa depuração plasmática. Sua ação foi prolongada com a via de administração subcutânea (SC), comparada à via intramuscular (IM), sugerindo a formação espontânea de depósito subcutâneo de liberação lenta desta substância, isto é, a sustentada presença de degarelix na circulação reflete a lenta liberação do depósito. A supressão de LH e a consequente supressão de T com Degarelix foram mais longas e aumentaram com a dose, podendo ser revertidas em todas as doses administradas. Por fim, degarelix mostrou menor proporção de liberação de histamina do que todos os outros antagonistas (BROQUA *et al.*, 2002), provando ser um potente e seguro antagonista do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

O perfil de absorção de degarelix foi estudado em cães e, em concordância com o último estudo mencionado, mostrou prolongada liberação do depósito, principalmente quando administrado pela via SC, onde a disponibilidade do fármaco no sangue foi dependente da concentração (um aumento na concentração da dose levou a uma diminuição na fração absorvida). Sendo assim, foi pressuposto que uma baixa concentração aumenta a fração absorvida e consequentemente a concentração plasmática, portanto quando altas concentrações iniciais do fármaco se fizerem necessárias na clínica pode-se escolher a via IM (AGERSO *et al.*, 2003).

O metabolismo e excreção de Degarelix também foram analisados, em diferentes espécies (ratos, cães e macacos) e *in vitro*. Degarelix na sua forma inalterada e como metabólito é totalmente excretado via hepática e urinária. A excreção da forma inalterada se dá principalmente via urina e está sujeita a extensiva degradação peptídica durante eliminação via hepatobiliar, provavelmente a partir de enzimas do duodeno e jejuno ou por bactérias intestinais dos ratos, uma vez que o fármaco mostrou-se pobre substrato para enzimas de degradação como P450. A exposição sistemática a qualquer produto de metabólito parece ser baixa (SONESSON *et al.*, 2011).

1.5 HIPOGONADISMO EM ANIMAIS

Homens podem ser considerados hipogonádicos, ou requerendo TRT, quando os níveis séricos de T total estão abaixo de 230ng/dL e apresentando

sinais e sintomas da doença (WANG, C. *et al.*, 2009). Já para homens castrados o nível padrão de T total é de 50ng/dL (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY ON PROSTATE CANCER, 2014), ou seja, existe ampla diferença hormonal em ser castrado e ser hipogonádico. A maioria dos experimentos animais, principalmente em ratos, que têm a intenção de estudar alterações relacionadas ao hipogonadismo, o faz através de castração cirúrgica, ou seja, retirada dos testículos a fim de diminuir a T sérica e gerar um estado hipogonádico (MIRANDA *et al.*, 2012). Porém, analisando os valores de T total sérica no homem nas duas condições mencionadas acima se pode entender que a castração não mimetiza um estado hipogonádico real na experimentação animal. Por exemplo, em um determinado estudo os valores séricos de T total em ratos controles foram, em média, de 2ng/mL e nos ratos castrados foram <25pg/mL (PRINCIVALLE, M. *et al.*, 2007), demonstrando a grande variação entre o normal e o castrado, portanto podemos pensar que possivelmente valores hipogonádicos ficariam entre estas faixas. O hipogonadismo criado pela castração tenta mimetizar uma condição primária, onde a falha principal é testicular e as gonadotrofinas encontram-se elevadas (DANDONA & ROSENBERG, 2010), além de ser intermitente nos animais, isto é, não podendo ser descontinuada.

Além da orquiectomia bilateral, Emir e colaboradores (2008) estudaram outro meio de castração em ratos Wistar: a administração de solução salina hipertônica 20% diretamente nos testículos (o mecanismo de ação é um desbalanço osmótico, o qual leva a desidratação intracelular e morte celular). Os resultados mostraram que esta solução gerou níveis castrados nos animais, com certa atrofia testicular, sem demais efeitos adversos como infecção ou necrose de pele. Porém, não se sabe o quanto essa administração pode causar dor. Concluiu-se que a solução salina hipertônica 20% intratesticular parece ser um método confiável de castração, sendo minimamente invasivo, com baixo custo e efetivo (EMIR *et al.*, 2008). Todavia, esta é mais uma forma de castração e não hipogonadismo em experimentação animal.

Em 1977, foi relatada uma cepa mutante de camundongo, designada com o símbolo *hpg* proveniente da palavra “hipogonadismo”, na qual os testículos e os ovários não se desenvolvem após o nascimento, provavelmente ocasionado por uma deficiência do GnRH, com consequente redução no

conteúdo hipofisário e nos níveis LH e FSH. O camundongo hpg é homozigoto para o alelo mutante GnRH I^{hpg} e por isso carece completamente de GnRH (CATTANACH *et al.*, 1977). Outra cepa foi relatada em 1984, originada de ratos com hidronefroze hereditária, reportando hipogonadismo severo e também com o símbolo hpg. Nesta cepa os órgãos sexuais estão presentes, porém são muito pequenos (SUZUKI *et al.*, 1988). Ocorre a determinação sexual das gônadas e a diferenciação inicial de todos os tipos celulares dos testículos, porém a diferenciação, proliferação e maturação destas células são afetadas no desenvolvimento pós-natal. Estes ratos possuem baixos níveis de T e altos níveis de FSH e LH comparados a animais intactos. O hipotálamo e a hipófise respondem ao estímulo de T exógena, mas os testículos não respondem ao FSH e GnRH, portanto configurando uma disfunção primária das células de Leydig (HAKAMATA *et al.*, 1988).

Estes estudos parecem ser bastante interessantes como modelos de hipogonadismo, todavia a primeira cepa citada carece totalmente do GnRH e não possui o desenvolvimento das gônadas e a outra cepa, de ratos, mimetiza um hipogonadismo primário. Além disso, em ambos os métodos os animais possuem o estado “hipogonádico” desde o nascimento. A partir destas colocações podemos refletir sobre a necessidade da criação de um modelo animal de hipogonadismo flexível, isto é, que possa ser gerado a qualquer momento da vida, onde experimentos possam avaliar os efeitos do estado hipogonádico em homens mais velhos, por exemplo.

2 JUSTIFICATIVA

As castrações cirúrgica (orquiectomia) e médica/química normalmente geram níveis extremos de testosterona sérica, os quais não representam verdadeiramente um estado hipogonádico que consiste em baixos níveis séricos de testosterona. Considerando a magnitude de tal síndrome em termos de prevalência e, principalmente, os vários potenciais efeitos observados na saúde, o desenvolvimento de um modelo animal de hipogonadismo que mimetize de forma mais realista esta condição é extremamente importante em termos de pesquisa clínica, tornando assim possíveis estudos que visem compreender os fenômenos relacionados a níveis subnormais de testosterona sérica e não apenas o que ocorre na castração, a qual determina deficiência grave de testosterona.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes doses de degarelix sobre os níveis de T ao longo do tempo a fim de gerar um estado hipogonádico a avliar os efeitos na hitomorfometria do pênis de ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar uma dose do fármaco degarelix que mimetize um estado hipogonádico em ratos Wistar adultos;
- b) Determinar os níveis séricos de testosterona em ratos submetidos a diferentes doses de degarelix;
- c) Avaliar a histomorfometria do corpo cavernoso de ratos submetidos a diferentes doses de degarelix.

4 ARTIGO

Different doses of degarelix on testosterone levels and effects in penile histomorphometry: An experimental study in rats

Authors

Gabriela Almeida Motta, Bel (1)

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD (2)

Cláudia Ramos Rhoden, PhD (1)

Graziele Halmenschlager, PhD (1,3)

Affiliation

1 - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – Post-graduating Course of Medical Sciences (PPG Ciências da Saúde), Porto Alegre, RS, Brazil

2- Professor of Urology at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Urologist at Irmandade Santa Casa de Porto Alegre (ISCMPA) and Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre (HMV).

3 – Centro Universitário Ritter dos Reis – UniRitter / Laureate International Universities – Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author:

Gabriela Almeida Motta

Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, RS,

Zip-code: 90050-170, Brazil.

Tel: 55 51 33038800; Fax: 55 51 33333144;

E-mail: gabi.amotta@hotmail.com

Conflict of Interest: None

**Runninghead: different doses of degarelix on testosterone levels and
penile histomorphometry**

**Different doses of degarelix on testosterone levels and effects in penile
histomorphometry: An experimental study in rats**

ABSTRACT

Introduction: Hypogonadism is a syndrome associated with erectile dysfunction (ED), low libido and changes in body mass. The diagnosis is based on clinical symptoms and subnormal values of testosterone (T).

Aim: To evaluate the effect of different doses of degarelix, an antagonist of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor, on serum T and to associate serum T with penile histomorphometry in Wistar rats.

Methods: Animals were divided into 6 groups: Control (n = 8-10); Orchiectomized + vehicle (n= 7); Degarelix 200 µg/Kg (n = 8-10); Degarelix 400 µg/Kg (n = 9); Degarelix 600 µg/Kg (n = 7-9) and Degarelix 800 µg/Kg (n = 9-10). Every 10 days, for 60 days, the animals received vehicle or solutions of degarelix subcutaneously (s.c.). The content of smooth muscle, collagen and elastic fibers of the corpus cavernosum (CC) were evaluated by specific microscopic morphometry. Serum T was measured by chemiluminescence. The results were considered statistically significant when P values were ≤ 0.05 .

Main outcome measures: The effects of different doses of degarelix on T levels and penile CC histomorphometric.

Results: Throughout the study, the serum T in Orchiectomized + vehicle, Degarelix 600 and Degarelix 800 groups decreased, and Degarelix 400 group reaching similar levels after the fourth administration ($P < 0.001$). After 60 days of treatment, in the same groups above mentioned, T levels reached those observed in the castrated animals differing only from Day 0 ($P < 0.001$). Body weight increased in both Control and Orchiectomized + vehicle groups, when comparing day 0 and day 60 ($P = 0.001$), but when comparing the groups on day 60, rats had a lower body weight in the Orchiectomized + vehicle group compared with the Control group ($P =$

0.001). The quantity of the trabecular smooth muscle was lower in Orchiec + vehicle group compared with the Control and Degarelix 200 groups ($P=0.003$). The area of the sinusoidal space was lower in all groups compared with the Control group ($P<0.001$).

Conclusion: Degarelix produced T levels similar to those of normal and castrated animals, depending on the dose, and all doses of degarelix (200-800 $\mu\text{g/Kg}$) modified the structure of the penile CC of rats.

Key-words: T levels; degarelix; hypogonadism; histomorphometry; animal model.

INTRODUCTION

Testosterone deficiency, or hypogonadism, is characterized by clinical symptoms associated with subnormal levels of testosterone (T). [1] This condition is not only related to the aging process [2,3] but is also associated with several clinical conditions, such as diabetes mellitus, metabolic syndrome and obesity. [4] Low libido, erectile dysfunction (ED), decreased muscle mass and increased fat mass, decreased body mass index (BMI), decreased vitality and depressed mood are considered the most common symptoms associated with androgen deficiency. [4] Although its symptoms are well known, the diagnosis of hypogonadism is still a controversial topic due to the wide range of serum T levels observed in healthy people and the different diagnostic cut-off points available in the literature. [5,6] It is highly recommended that clinical pictures should be associated with testosterone levels in order to establish diagnosis, since the fact that this condition is not essentially based on biochemical parameters. [4,5]

It is well established that T levels present an important relationship with normal sexual response. [7] Androgens, such as T, are involved in the regulation of corpus cavernosum (CC) components such as smooth muscle cells, metabolism of connective tissue and deposition of extracellular matrix. [8] Several studies have demonstrated that T deprivation decreases smooth muscle and sinusoidal space contents. [9,10,11] However, despite the achievement of low T in these studies, T deprivation was induced by surgical (bilateral orchiectomy) or medical castration, which may not accurately reflect clinical practice of hypogonadism.

Androgen deprivation therapy (ADT), a medical castration technique, is the first-line treatment of metastatic prostate cancer. [12] Degarelix is a rapid, potent and long-acting gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor antagonist that has

been used in ADT [13] and experimental studies, demonstrating safety and efficacy comparable to GnRH analog. [14,15]

As far as we know, there is no animal model that expresses subnormal levels of T for a long period of time, thus simulating clinical hypogonadism. Therefore, considering the magnitude of this clinical condition in terms of prevalence and its effects on male health, the development of an animal hypogonadal model is extremely important for clinical research.

AIMS

The aim of this study is to evaluate the effect of different doses of degarelix on serum T in order to generate a hypogonadic state and to associate serum T with penile histomorphometry in Wistar rats.

METHODS

Animals

The Animal Care Committee of Porto Alegre Federal University of Health Sciences approved this study, and all efforts were made to minimize the discomfort, distress and suffering of the animals. All animal studies were performed according to ethical care guidelines.

Rats were maintained under a standard temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12 h light/dark cycle, were fed a standard laboratory rat chow and had water available *ad libitum*.

Drugs

Degarelix (600 $\mu\text{g/mL}$; Firmagon[®], Ferring Pharmaceuticals, Saint-prex, Switzerland) was prepared in 5% mannitol solution and injected subcutaneously in the scapular region [14] at different doses (200 $\mu\text{g/Kg}$, 400 $\mu\text{g/Kg}$, 600 $\mu\text{g/Kg}$ and 800 $\mu\text{g/kg}$). The Control group received 5% mannitol solution, 1 mL/Kg.

Ketamine (100 mg/mL; Cetamin[®], Syntec, Cotia, SP, Brazil) and xylazine (20 mg/mL; Anasedan[®], Jacareí, SP, Brazil) at 80 mg/Kg and 10 mg/Kg, respectively, were given by intraperitoneal (i.p.) injection as anesthetic agents.

Ibuprofen (20 mg/mL; Buprovil[®], Multilab, São Jerônimo, RS, Brazil) at 20 mg/Kg was given by gavage to animals as an analgesic agent.

Study design

Ninety-day-old, male Wistar rats weighing from 230 to 360 g were divided into six groups and treated as follows: Control group (n= 8-10): intact animals that

received 5% mannitol solution vehicle; Orchiec + vehicle group (n= 7): underwent bilateral orchiectomy that received 5% mannitol solution vehicle; Degarelix 200 group (n= 8-10): intact animals that received degarelix at 200 µg/Kg; Degarelix 400 group (n= 9): intact animals that received degarelix at 400 µg/Kg; Degarelix 600 group (n= 7-9): intact animals that received degarelix at 600 µg/Kg and Degarelix 800 group (n= 9-10): intact animals that received degarelix at 800 µg/Kg. All animals received degarelix or vehicle solutions by subcutaneous injection (s.c.) every ten days.

Blood samples were drawn every ten days before degarelix or vehicle administration, starting on Day 0. On Day 0, blood samples were drawn to analyze the animals' baseline T serum levels. Right after this procedure, degarelix or 5% mannitol solution vehicle were injected subcutaneously. A total of 7 blood samples (Day 0, Day 10, Day 20, Day 30, Day 40, Day 50 and Day 60) and 6 degarelix or vehicle administrations were performed during the experimental period (60 days). Blood samples were collected through retro-orbital arteriovenous plexus puncture under anesthesia. Serum was extracted by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. All blood samples were frozen and stored at -80°C until the time of analysis. Sixty days after the beginning of the treatment, all animals were euthanized with an anesthetic overdose of ketamine and xylazine.

Animals' body weight was monitored every ten days with a digital electronic scale (Mallory Ltda, Brazil) for degarelix dose adjustment.

Surgical castration of animals

Rats from Orchiec + vehicle group were anesthetized by a ketamine and xylazine injection (80 mg/Kg and 10 mg/Kg i.p, respectively) and submitted to bilateral orchiectomy. The surgical procedure was performed with a 2-cm scrotal

midline incision, and both testes were removed. Ibuprofen (Buprovil[®], Multilab, São Jerônimo, RS, Brazil) 20 mg/kg, every 8h, was given by gavage to animals as an analgesic agent for two days following the procedure.

Measurement of serum testosterone

Serum total T levels were measured by chemiluminescence (Immulite[®] 1000, Siemens, USA). The results are expressed in ng/dL.

Histological procedures

At the end of experiment, the entire penile tissue was obtained by dissecting the foreskin and shaft skin up to the crura. Sterile cotton gauze was used to gently remove excess blood. The penile tissue was immediately fixed in 10% buffered formalin, and penile mid-shaft segments were embedded in paraffin according to standard histological techniques.

For histomorphometric analysis, a total of five 100-µm equidistant, transversal penile tissue sections (5 µm thick) were acquired from each specimen. From each section, five random fields were analyzed, totaling 25 evaluated fields (test areas) per animal, per stain used. [16] Tissue sections followed routine histological staining.

Azan's trichrome staining, which highlights smooth muscle (red) and connective tissue (blue), was used to assess the mean percentage of smooth muscle in penile cavernosal tissue. The same staining was used to quantify sinusoidal space.

Corpus cavernosum elastic system components were evaluated using Weigert's Fucsin-Resorcin staining, with previous oxone oxidation, to detect oxitalan, elaunin and elastic fibers. [16]

Due to the collagen fibers' birefringence, all sections were also stained with Picrosirius red and were observed under light polarization to quantify collagen fibers. [17]

Histomorphometric measurements

All histological analyses were performed by the same examiner who was blind to the animal's treatment. Image acquisition and digitalization were performed with a digital camera (DP72, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a light microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan). All images were obtained in a standardized method to ensure uniformity of the image.

Smooth muscle, sinusoidal space (X400 final magnification) and elastic fiber content (X1000 final magnification) were quantified using a manual, point-counting method [18]. For each image, a 100-point grid (ImageJ 1.45s, NIH, USA) was overlaid on the digitalized field, and the points touching the evaluated area were counted. The percentages of smooth muscle, sinusoidal space and elastic fibers content were calculated by dividing the number of points counted per number of total points x 100.

Due to characteristic collagen birefringence, collagen content was determined using a semi-automated color segmentation method (Image-Pro® Plus software, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). [18] This method is based on converting an image to a binary image by applying a mask with consequent conversion of the selected component into a black-and-white image. [18] By analyzing the histogram of the image, it is possible to quantify the selected histological structure. [18] In our study, the image background was selected, and we applied a mask, where the image background and other histological components became white and the area occupied

by collagen fibers became black. The software calculated the area (%) occupied by the black color (collagen). [18]

Mean values for each CC (the mean of the 25 images analyzed per rat) were calculated and used to compare the 6 groups.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) for hormonal data over time and as mean $\pm$ standard deviation (SD) for all other data. For hormonal data and body weight over time, two-way repeated measures Analysis of Variance (ANOVA) was performed followed by Tukey's post-hoc test. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used to compare baseline levels of serum T, baseline animal's body weight, smooth muscle, sinusoidal space, elastic fibers and collagen content among groups. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

All statistical analyses were performed using SPSS statistical software package version 12.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). The graphic was generated with SigmaPlot software version 11.0 for Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

MAIN OUTCOME MEASURES

The effects of different doses of degarelix on T levels and penile CC histomorphometric.

RESULTS

The descriptive analysis of serum testosterone is demonstrated in Table 1.

At baseline, before the administration of the drug or castration (Day 0), all animals had their serum T evaluated, and no statistically significant differences were observed between the groups ($P=0.713$).

As depicted in Figure 1, a significant suppression was observed in serum T levels in the Orchiec + vehicle, Degarelix 600 and Degarelix 800 groups throughout the study ($P<0.001$). At the end of the study, in the same groups above mentioned, T levels reached those observed in the castrated animals differing only from Day 0 ($P<0.001$). In the Degarelix 400 group, there was a decrease in T levels to castrated levels only after the fourth administration of the drug ($P<0.001$).

As observed in Figure 2, there was no difference in body weight of animals in all groups at baseline (Control = 307.30 ± 21.54 g; Orquiec = 275.86 ± 19.58 g; Degarelix 200 = 286.33 ± 26.86 g; Degarelix 400 = 289.67 ± 32.69 g; Degarelix 600 = 285.56 ± 41.38 ; Degarelix 800 = 286.00 ± 29.67 g) (Day 0, $P=0.378$). During the experimental period, body weight increased in the Control and Orchiec + vehicle groups when comparing Day 0 and Day 60 ($P=0.001$), and this increase was less significant in the Orchiec + vehicle group. However, when comparing body weight at the end of the study (Day 60), rats in the Orchiec + vehicle group (288.57 ± 16.33 g) weighed less than did those in the Control group (334.26 ± 26.59 g) ($P=0.001$).

Regarding the mean trabecular smooth muscle content, the levels were lower in the Orchiec + vehicle group (4.90 ± 2.10) compared with the Degarelix 200 (8.97 ± 2.62) and Control groups (8.55 ± 1.61) ($P=0.003$, Figures 3 and 4). Additionally, in terms of sinusoidal space content, significantly lower levels were observed in all groups (Orquiec = 31.42 ± 3.09 ; Degarelix 200 = 35.42 ± 3.97 ; Degarelix 400 =

31.52 ± 4.76; Degarelix 600 = 30.83 ± 4.55; Degarelix 800 = 28.95 ± 4.38) compared to the Control group (41.35 ± 5.36 %) (P<0.001). No statistically significant difference was found in the content of mean elastic fibers (Control = 5.04 ± 1.35; Orquiec = 4.17 ± 1.26; Degarelix 200 = 4.66 ± 1.59; Degarelix 400 = 4.39 ± 1.31; Degarelix 600 = 3.61 ± 1.25; Degarelix 800 = 3.99 ± 1.33) (P=0.281) and collagen (Control = 30.51 ± 7.53; Orquiec = 29.64 ± 7.15; Degarelix 200 = 32.69 ± 10.04; Degarelix 400 = 32.96 ± 9.54; Degarelix 600 = 33.71 ± 9.25; Degarelix 800 = 32.95 ± 5.37) (P=0.904, Figures 3 and 4) among groups.

CONCLUSIONS

At baseline, the serum T levels of the different groups of animals were similar. Degarelix in different doses caused subnormal serum T levels. At the end of 60 days, doses of degarelix between 400 mg/kg and 800 mg/kg yielded levels similar to those observed in the Orchiect + vehicle group. Even at a dose of 200 mg/kg of degarelix, where greater, but hypogonadal, levels of T were observed compared with the other treatment groups, structural changes occurred in the CC. Orchiectomy and degarelix doses between 200 mg/kg and 800 mg/kg produced significant changes in sinusoidal space content. However, only the orchiectomy produced a reduction in mean trabecular smooth muscle content of the CC. No changes in the contents of elastic and collagen fibers were observed in any of the degarelix treatment groups.

As expected, the T levels decreased after orchiectomy because it is known that castration leads to androgen ablation. The literature describes that after castration, serum T is reduced to castrated levels from 3 to 12 hours in humans [19] and significantly during the first 4 hours in rats. [20]

With the dose of degarelix at 200 µg/Kg, the levels of serum T remained similar to the controls for the entire study period but in a subnormal level. The absence of an observed effect may be related to the time at which the blood collections were performed; that is, with 200 µg/Kg of degarelix, the levels of serum T could have decreased and then returned to baseline within 10 days. This possibility is supported by the finding of Broqua and colleagues (2002) who, with the same dose and animal model, observed suppression of luteinizing hormone (LH for 6 days and a subsequent return of LH to baseline on the 7th day; the half-life of the drug was 67 hours). [14]

The results of this study are in agreement with the literature because degarelix is often effective for ADT and the treatment of prostate cancer. [21,22] Its action is well established as a potent GnRH receptor antagonist ensuring long-term chemical castration. [23,14] The antagonists are believed to be as effective as castration (orchiectomy) for hormone reduction. [24] In the present study, the T levels with higher doses of degarelix (600 µg/Kg and 800 µg/Kg) were similar to the Orchiec + vehicle group, showing a probable blocking action of degarelix in the production of T. Although aging can decrease the T concentrations, it did not contribute to these findings, as evidenced by homogeneity in serum T in the Control group throughout the study.

Throughout this study, with a dose of degarelix at 400 µg/Kg, serum T levels decreased more gradually until they reached levels of castrated animals; the results were statistically significant after the fourth administration of the drug (Day 40). An explanation for such an event could be a cumulative effect of ablation with time. As such, GnRH receptors may have been down-regulated and not merely occupied by receptor antagonists. [25]

In this study, the Control and Orchiec + vehicle groups demonstrated an increase in body weight over time, which we expected due to normal animal growth. At the end of experiment, surgical castration weighed less than controls and the use of degarelix presented no effect on weight gain. In humans, it is well reported that the ADT, as well as degarelix, may result in some adverse effects including weight gain. [13,30,31] T deficiency is often associated with increased fat mass, reduced lean body mass and insulin resistance. [4] These changes in body composition tend to be reflected in body weight. Hypogonadal men with T replacement therapy have significant weight loss with a marked reduction in BMI and waist circumference, [27]

whereas androgen deprivation leads to a significant weight gain after the initiation of ADT, [28] accompanied by increased fat mass and decreased lean body mass. [29]

Interestingly, androgen deprivation in various animal experiments has results opposite to those observed in body weight in men. In agreement with our results, some studies have shown no difference in body weight [32,33,34,35] or a reduction in weight gain in rats after castration. [36,37,38,39] The reason for these effects is not clear. GnRH antagonists have also demonstrated no body weight change in rats. [24] Inoue and colleagues (2010) believe that the effects of castration differs between rodent models and clinical observations. [38] A reduction in body weight has been observed in castrated dogs, [39] castrated monkeys, [40] and even different strains of castrated rats. [41] These findings suggest that gonadal hormone ablation leads, by different mechanisms, to the gain/weight loss among species. In addition, some authors have observed concomitant hypophagia (food intake reduction), [36,42] lower levels of glucose and energy intake reduction [38] after androgen ablation in mice.

It is well established that androgens are necessary for the maintenance of the components of CC and proper erectile function in both humans and mice. In the absence of androgens, as in castration, some penile structures and functions may be impaired. [43,44,45] In agreement with the results presented, others have observed a decrease in trabecular smooth muscle and sinusoidal space contents after castration. [9-11,45] Other studies suggest the occurrence of apoptosis in the trabecular smooth muscle cells and consequent fibrous tissue replacement in CC in rats and rabbits. [9,43] Additionally, androgen ablation caused changes in the synthesis and release of vasoactive factors and other aspects of the $\alpha 1$ adrenergic pathway that disrupted the erectile response in rabbits. [10] Moreover, a lack of androgens has been

implicated in adipogenic and myogenic pathways in pluripotent cell culture. [26] Furthermore, rabbits with low levels of androgens typically accumulate fat in their CC and experience a reduced erectile response. [46]

No prior study evaluating the effect of degarelix on CC penile structures in rats was found in the literature. Furthermore, we are unaware of other assessments of sinusoidal space in response to other GnRH agonists and antagonists. Traish and colleagues (2003), using both surgical and medical (GnRH agonist) castration techniques, noted a decrease in content, organization and thickness of the trabecular smooth muscle. [10] The administration of GnRH antagonists to rats, during the neonatal period, altered gene expression biomarkers for the differentiation of smooth muscle cells, leading to loss of these cells in the penile CC. [47] However, the sinusoidal space content was not analyzed in these studies.

Unlike most studies, the collagen content was not altered by surgical or chemical castration in the present study. Miranda and colleagues (2012) also observed the conservation of collagen content and believed that this discrepancy was related to the methods used like to evaluate collagen density and not the absolute values. [11] Previous studies in our laboratory not demonstrated correlation between serum T levels and collagen content of the penile CC in castrated rats and some explanation could be the different study designs, animal models and/or morphometric methods. [48] The same study indicated that androgens do not affect the elastic fibers content such as the present study. [48] Inoue and colleagues (2012) observed no influence of T on the synthesis of elastic fibers corroborating the prior results. [49] Furthermore, as demonstrated by Pinheiro and colleagues (2000), mouse CC is distinguishable from man CC in content and organization, [50] so these aspects should be considered when extrapolating results to humans.

There are some limitations in the current study, as a high hormonal variation among animals and serum T concentrations that were less than the assay sensitivity of 20 ng/dL. Thus, the real values of hormones may have been overestimated, thus hiding the hypogonadal values.

In conclusion, from the results observed in the current study it is suggested that a dose of degarelix between 200 µg/Kg and 400 µg/Kg was able to produce a hypogonadal state in rats and significant impact in some histomorphometric characteristics of the CC structure. In addition, in uncastrated rats that were treated with degarelix, we observed a significant impact on the relative levels of T and the structure of CC, suggesting the importance of androgens in the maintenance of penile histomorphometry in rats.

REFERENCES

- 1 - Morales, A, Buvat, J, Gooren, LJ, Guay, AT, Kaufman, JM, Tan, HM, Torres, LO. Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. J Sex Med 2004; 1:69-81.
- 2 - Araujo, AB, O'Donnell, AB, Brambilla, DJ, Simpson, WB, Longcope, C, Matsumoto, AM, McKinlay, JB. Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-age and older men: estimates from the massachusetts male aging study. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 5920-6.
- 3 - Mulligan, T, Frick, MF, Zuraw, QC, Stemhagen, A, McWhirter, C. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the him study. Int J Clin Pract 2006; 60:762-9.
- 4 - Dandona, P, Rosenberg, MT. A practical guideline to male hypogonadism in the primary care setting. Int J Clin Pract 2010; 64: 682-696.
- 5 - Pantalone, KM, Faiman, C. Male hypogonadism: more than just a low testosterone. Cleve Clin J Med 2012; 79: 717-25.
- 6 - Paduch, DA, Brannigan RE, Fuchs, EF, Kim, ED, Marmar, JL, Sandlow, JL. The laboratory diagnosis of testosterone deficiency. Urology 2014; 83: 980-8.
- 7 - Gurbuz N, Mammadov E, Usta FM: Hypogonadism and erectile dysfunction: an overview. Asian J Androl 2008; 10: 36
- 8 - Traish, AM, Guay, AT. Are androgens critical for penile erections in humans? Examining the clinical and preclinical evidence. J Sex Med 2006; 3: 382-404.
- 9 - Traish AM, Park K, Dhir V *et al*: Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. Endocrinology 1999; 140: 1861.
- 10 - Traish AM, Munarriz R, O'Connell L *et al*: Effects of medical or surgical castration on erectile function in an animal model. J Androl 2003; 24: 381;

- 11 - Miranda AF, Gallo CBM, de Souza DB *et al*: Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. J Androl 2012; 33: 1224
- 12 – Sociedade Brasileira de Urologia (SBU). Diretrizes de Câncer de Próstata. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < <http://www.sbu.org.br/?diretrizes>>.
- 13 - Carter, NJ, Keam, SJ. Degarelix: a review of its use in patients with prostate cancer. Drugs 2014; 74: 699-712.
- 14 - Broqua, P, Riviere, PJ, Conn, PM, Rivier, JE, Aubert, ML, Junien, JL. Pharmacological profile of a new, potent, and long-acting gonadotropin-releasing hormone antagonist: degarelix. J Pharmacol Exp Ther 2002; 301: 95-102.
- 15- Klotz, L, Miller, K, Crawford, ED, Shore, N, Tombal, B, Karup, C, Malmberg, A, Persson, BE. Disease control outcomes from analysis of pooled individual patient data from five comparative randomized clinical trials of degarelix versus luteinizing hormone-releasing hormone agonists. Eur Urol 2014; S0302-2838: 01491-7.
- 16 - Figueiredo, MA, Ribeiro, IC, Chagas, MA, Cardoso, LEM, Costa, WS, Sampaio, FJB. The penis in diabetes: structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. BJU Int 2010; 108: 400 – 404
- 17 - Montes, GS, Junqueira, LCU: The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1991; 86: 1-11.
- 18 - Amenábar, JM, Martins, GB, Cherubini, K, Figueiredo, MAZ. Comparison between semi-automated segmentation and manual point-counting methods for quantitative analysis of histological sections. J Oral Sci 2006; 48: 139-143.
- 19 - Lin, BJ, Chen, KK, Chen, MT, Chang, LS. The time for serum testosterone to reach castrate level after bilateral orchiectomy or oral estrogen in the management of metastatic prostatic cancer. Urology 1994; 43: 834-837.

- 20 - Hu, M, Xin, D, Chen, J, Sun, G, Wang, Y, Na, Y. Changes in the androgen levels in the ventral prostate of spontaneously hypertensive rats after castration. *BJU International* 2009; 104: 406-411.
- 21 - Boccon-Gibod, L, van der Meulen, E, Persson, BE. An update on the use of gonadotropin-releasing hormone antagonists in prostate cancer. *Ther Adv Urol* 2011; 3: 127-140.
- 22 - Al-Inany, HG, Youssef, MA, Aboulghar, M, Broekmans, F, Sterrenburg, M, Smit, J, Abou-Setta, AM. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 11.
- 23 - Princiville, M, Broqua, P, White, R, Meyer, J, Mayer, G, Elliott, L, Bjarnason, K, Haigh, R, Yea, C. Rapid suppression of plasma testosterone levels and tumor growth in the dunning rat model treated with degarelix, a new gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 1113-1118.
- 24 - Tieva, A, Bergh, A, Damber, JE. The clinical implications of the difference between castration, gonadotrophin releasing hormone (GnRH) antagonists and agonists treatment on the morphology and expression of GnRH receptors in the rat ventral prostate. *BJU Int* 2003; 91: 227-233.
- 25 - Halmos, G, Schally, AV, Pinski, J, Vadillo-Buenfil, M, Groot, K. down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2398-2402.
- 26 - Singh, R, Artaza, JN, Taylor, WE, Gonzalez-Cadavid, NF, Bhasin, S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 2003; 144: 5081-5088.

- 27 - Yassin, A, Doros, G. testosterone therapy in hypogonadal men results in sustained and clinically meaningful weight loss. Clin Obes 2013; 3:73-83.
- 28 - Seible, DM, Gu, X, Hyatt, AS, Beard, CJ, Choueiri, TK, Efstathiou, JA, Miyamoto, DT, Mitin, T, Martin, NE, Sweeney, CJ, Trinh, QD, Beckman, JA, Basaria, S, Nguven, PL. Weight gain on androgen deprivation therapy: which patients are at highest risk? Urology 2014; 83: 1316-1321.
- 29 - van Londen, GJ, Levy, ME, Perera, S, Nelson, JB, Greenspan, SL. Body composition changes during androgen deprivation therapy for prostate cancer: a 2-year prospective study. Crit Rev Oncol Hematol 2008; 68: 172-177.
- 30 - Trost, LW, Serefoglu, E, Gokce, A, Linder, BJ, Sartor, AO, Hellstrom, WJ. Androgen deprivation therapy impact on quality of life and cardiovascular health, monitoring therapeutic replacement. J Sex Med 2013; 1:84-101.
- 31 - Degarelix. More rapid medical castration, nothing more. Prescrire Int 2010; 19: 106-108.
- 32 - Rothwell, NJ, Stock, MJ. Increased body-weight gain and body protein in castrated and adrenalectomized rats treated with clenbuterol. Br J Nutr 1988; 60: 355-360.
- 33 - Vieira, JS, Saraiva, KL, Barbosa, MC, Porto, RC, Cresto, JC, Peixoto, CA, Wanderley, MI, Udrisar, DP. Effect of dexamethasone and testosterone treatment on the regulation of insulin-degrading enzyme and cellular changes in ventral rat prostate after castration. Int J Exp Pathol 2011; 92: 272-280.
- 34 - Zhang, X, Zang, N, Wei, Y, Yin, J, Teng, R, Seftel, A, Disanto, ME. Testosterone regulates smooth muscle contractile pathways in the rat prostate: emphasis on PDE5 signaling. Am J Physiol Endocrinol Metab 2012; 302: E243-253.

- 35 - Tajul Ariff, AS, Soelaiman, IN, Pramanik, J, Shuid, AN. Effects of *Eurycoma longifolia* on Testosterone Level and Bone Structure in an Aged Orchidectomised Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012;2012:818072.
- 36 - Kral, JG, Tisell, LE. The effects of castration on body composition, adipose tissue cellularity and lipid and carbohydrate metabolism in adult male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1976; 81: 644-654.
- 37 - Krotkiewski, M, Kral, JG, Karlsson, J. Effects of castration and testosterone substitution on body composition and muscle metabolism in rats. *Acta Physiol Scand* 1980; 109: 233-237.
- 38 - Inoue, T, Zakikhani, M, David, S, Algire, C, Blouin, MJ, Pollak, M. Effects of castration on insulin levels and glucose tolerance in the mouse differ from those in man. *Prostate* 2010; 70: 1628-1635.
- 39 - Lin, SN, Yu, PC, Huang, JK, Yang, MC, Chang, LS, Chai, CY, Kuo, JS. Castration may not affect the penile erection ability in terms peripheral neurocavernous mechanism in dogs. *J Urol* 1990; 143:172-174.
- 40 - Nagarajan, P, Arindkar, S, Singh, S, Majumdar, SS. Effect of long-term castration on serum biochemistry in rhesus monkeys. *J Med Primatol* 2013; 42: 132-136.
- 41 - Borst, SE, Conover, CF. Orchiectomized Fisher 344 male rat models body composition in hypogonadal state. *Life Sci* 2006; 79: 411-415.
- 42 - Gentry, RT, Wade, GN. Androgenic control of food intake and body weight in male rats. *J Comp Physiol Psychol* 1976; 90: 18-25.
- 43 - Mills, TM, Wiedmeier, VT, Stopper, VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod* 1992; 46:342-348.

- 44 - Shen, ZJ, Zhou, XL, Lu, YL, Chen, ZD. Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian J Androl* 2003; 5: 33-36.
- 45 - Rogers, RS, Graziottin, TM, Lin, CS, Kan, YW, Lue, TF. Intracavernosal vascular endothelial growth factor (VEGF) injection and adeno-associated virus-mediated VEGF gene therapy prevent and reverse venogenic erectile dysfunction in rats. *Int J Impot Res* 2003; 15: 26-37.
- 46 - Traish, AM, Toselli, P, Jeong, SJ, Kim, NM. Adipocyte accumulation in penile corpus cavernosum of the orchietomized rabbit: a potential mechanism for veno-occlusive dysfunction in androgen deficiency. *J Androl* 2005; 26: 242-248.
- 47 - Okumu, LA, Braden, TD, Vail, K, Simon, L, Goyal, HO. Low Androgen Induced Penile Maldevelopment Involves Altered Gene Expression of Biomarkers of Smooth Muscle Differentiation and a Key Enzyme Regulating Cavernous Smooth Muscle Cell Tone. *J Urol* 2012; S0022-5347:06073-4.
- 48 – Halmenschlager, G. Alterações histomorfométricas e grau de apoptose no corpo cavernoso de ratos em privação androgênica submetidos ou não a reposição hormonal com testosterona [tese]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2014.
- 49 - Inoue T, Miki Y, Abe K, Hatori M, Hosaka M, Kariya Y, Kakuo S, Fujimura T, Hachiya A, Honma S, Aiba S, Sasano H. Sex steroid synthesis in human skin in situ: the roles of aromatase and steroidogenic acute regulatory protein in the homeostasis of human skin. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 362(1-2):19-28.
- 50 - Pinheiro, AC, Costa, WS, Cardoso, LE, Sampaio, FJ. Organization and relative content of smooth cells, collagen, and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol* 2000; 164:1802-1806.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of different doses of degarelix on serum T levels over time

Mean $\pm$ SEM values of rat serum testosterone levels; * $P < 0.001$ for Days 10, 20, 30, 40, 50 and 60 compared to Day 0 in the Orchiec + vehicle, Degarelix 600 and Degarelix 800 groups. ** $P < 0.001$ for Days 40, 50 and 60 compared to Day 0 in the Degarelix 400 group. P values obtained by two-way repeated measures ANOVA. Control group = intact animals and received 5% mannitol solution vehicle (n = 9); Orchiec + vehicle group = underwent bilateral orchiectomy and received 5% mannitol solution vehicle (n = 7); Degarelix 200 group = intact animals and received doses of degarelix at 200 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 8); Degarelix 400 group = intact animals and received doses of degarelix at 400 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 9); Degarelix 600 group = intact animals and received doses of degarelix at 600 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 7) and Degarelix 800 group = intact animals and received doses of degarelix at 800 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 9).

Figure 2: Effect of different doses of degarelix on body weight

Mean $\pm$ SD values of rat body weight; * $P = 0.001$ for Day 60 compared with Day 0 in the Control and Orchiec + vehicle groups. ** $P = 0.001$ compared with the Control and Orchiec + vehicle groups at Day 60. P values obtained by two-way repeated measures ANOVA. Control group = intact animals and received 5% mannitol solution vehicle (n = 10); Orchiec + vehicle group = underwent bilateral orchiectomy and received 5% mannitol solution vehicle (n = 7); Degarelix 200 group = intact animals and received doses of degarelix at 200 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 9); Degarelix 400 group = intact animals and received doses of degarelix at 400 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 9); Degarelix 600 group = intact animals and received doses of degarelix at 600 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 9) and Degarelix 800 group = intact animals and received doses of degarelix at 800 $\mu\text{g/Kg}$ (n = 10).

Figure 3: Effect of different doses of degarelix on penile histomorphometry at end of study

Percent mean $\pm$ SD values of A) Rat corpus cavernosum smooth muscle content when compared to the Control, Degarelix 200 and Orchiect + vehicle groups; *P = 0.003; B) Rat corpus cavernosum sinusoidal space content compared with the Control group; *P<0.001; C) Rat corpus cavernosum elastic fibers content; P = 0.281; D) Rat corpus cavernosum collagen content; P = 0.904. P values obtained by one-way ANOVA. Control group = intact animals and received 5% mannitol solution vehicle (n = 10); Orchiect + vehicle group = underwent bilateral orchiectomy and received 5% mannitol solution vehicle (n = 7); Degarelix 200 group = intact animals and received doses of degarelix at 200 μ g/Kg (n = 10); Degarelix 400 group = intact animals and received doses of degarelix at 400 μ g/Kg (n = 9); Degarelix 600 group = intact animals and received doses of degarelix at 600 μ g/Kg (n = 9) and Degarelix 800 group = intact animals and received doses of degarelix at 800 μ g/Kg (n = 10). In figure 3C Orchiect +vehicle group n= 6.

Figure 4: Photomicrographs of CC in different doses of degarelix at end of study

Photomicrographs of rat corpus cavernosum illustrating Azan's trichrome staining (Blue: collagen, red: smooth muscle and white: sinusoidal space) at X400 magnification (A, B, C, D, E and F), Picrosirius red under polarization at X400 magnification (G, H, I, J, K and L) and Weigert's Fuchsin-Resorcin staining at X1000 magnification (M, N, O, P, Q and R).

A, G, M: Control group = intact animals and received 5% mannitol solution vehicle;

B, H, N: Orchiect + vehicle group = underwent bilateral orchiectomy and received 5%

mannitol solution vehicle; C, I, O: Degarelix 200 group = intact animals and received doses of degarelix at 200 µg/Kg; D, J, P: Degarelix 400 group = intact animals and received doses of degarelix at 400 µg/Kg; E, K, Q: Degarelix 600 group = intact animals and received doses of degarelix at 600 µg/Kg; F, L, R: Degarelix 800 group = intact animals and received doses of degarelix at 800 µg/Kg.

Figure 1

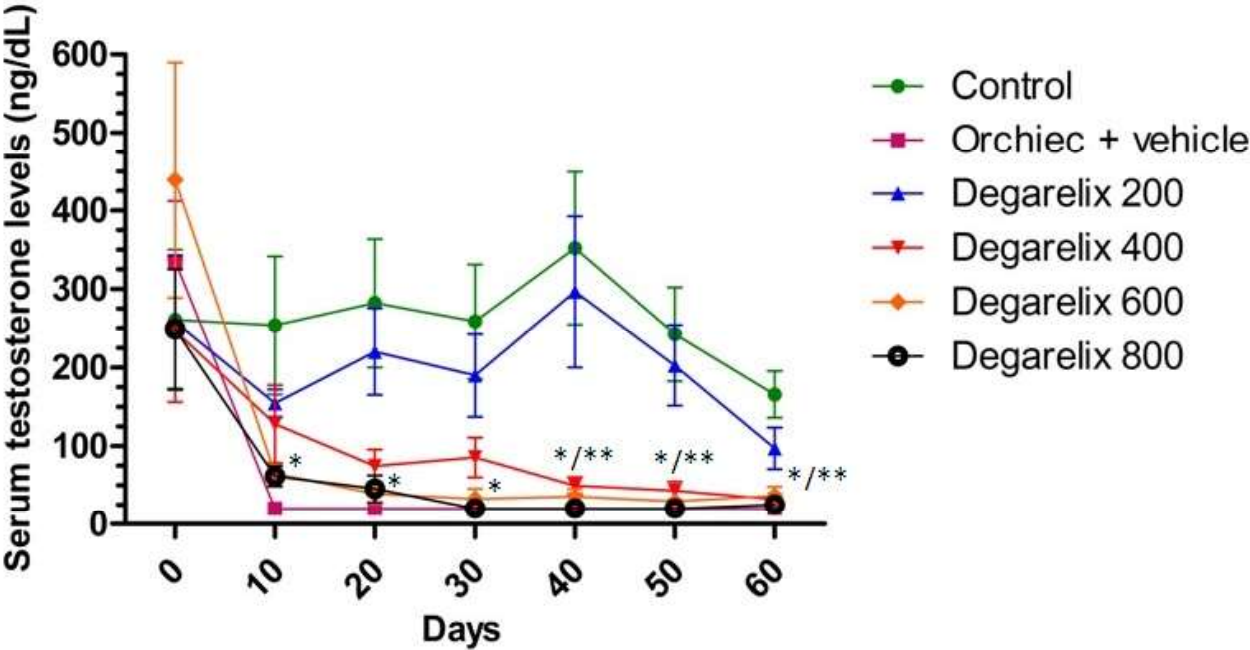


Figure 2

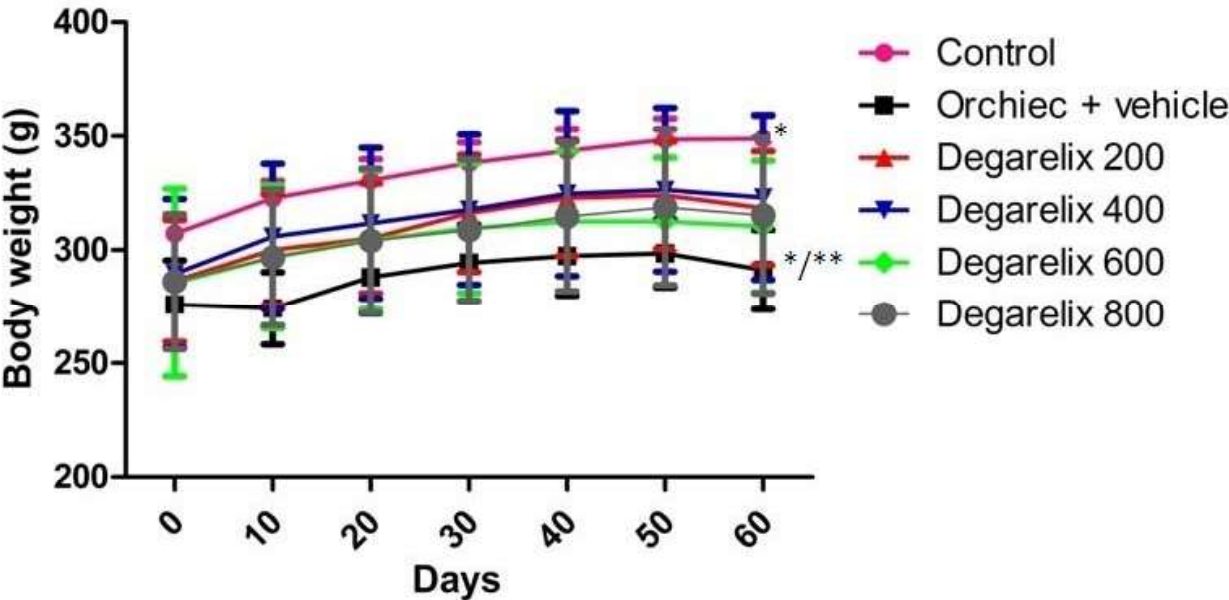


Figure 3

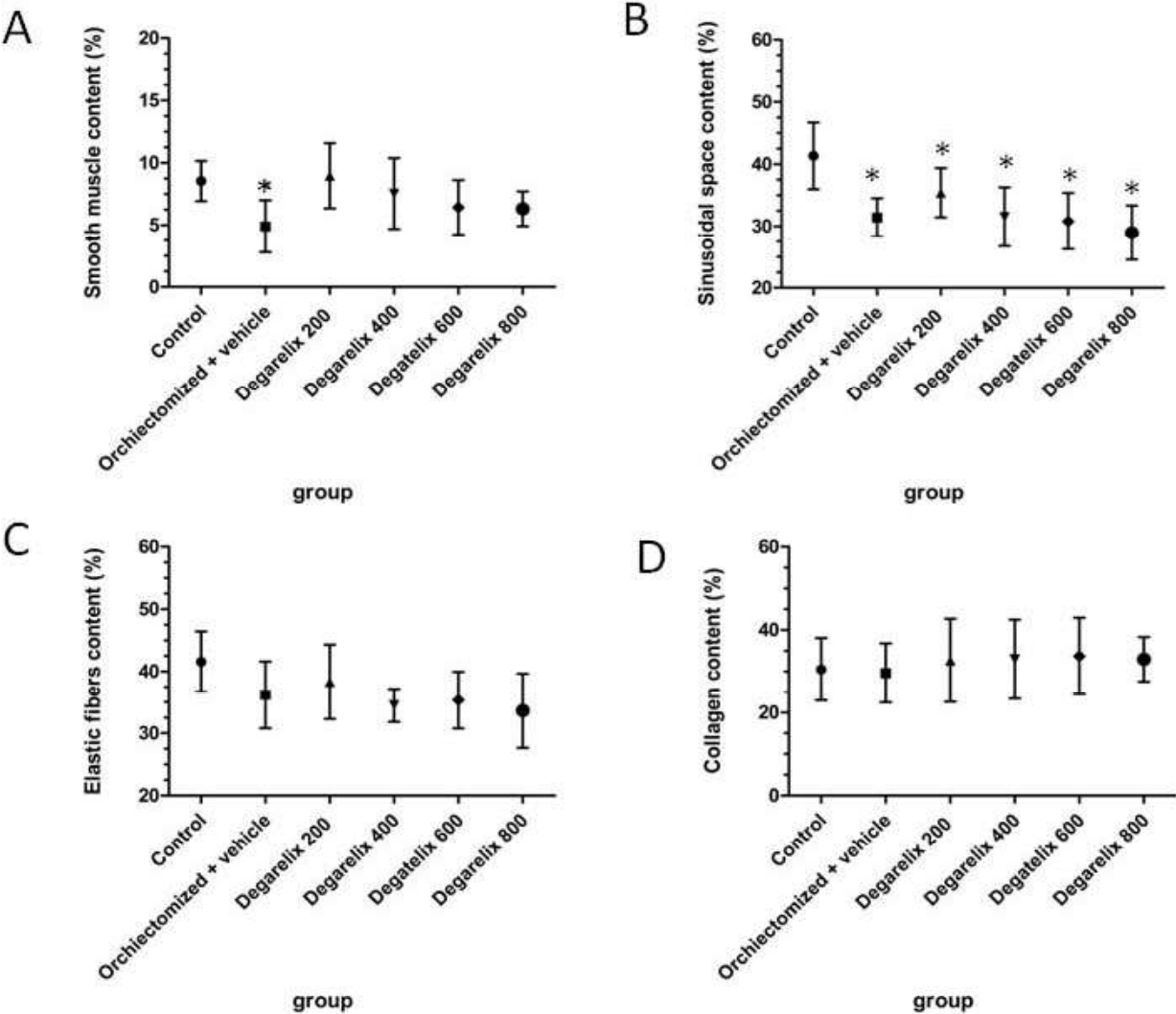
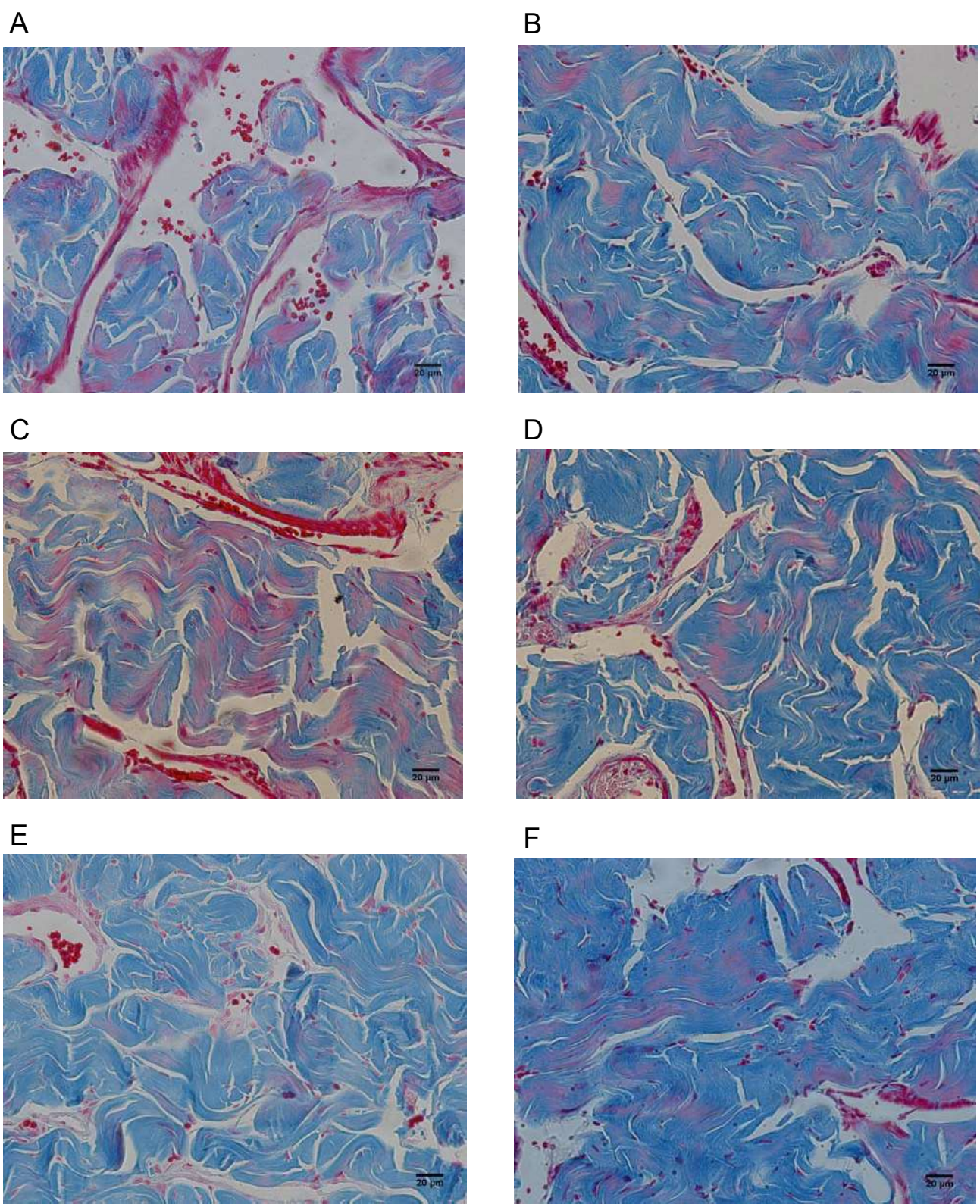


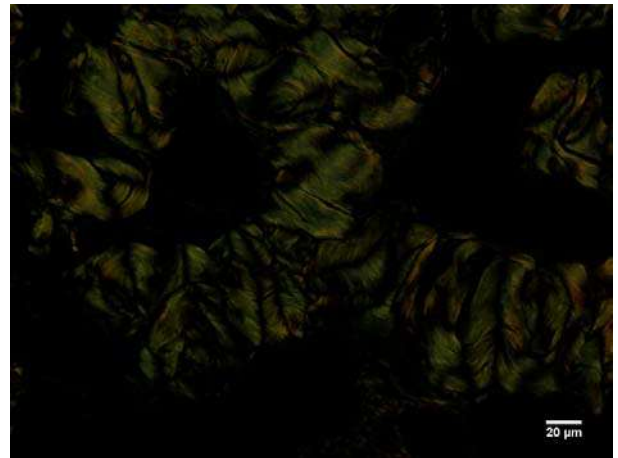
Figure 4



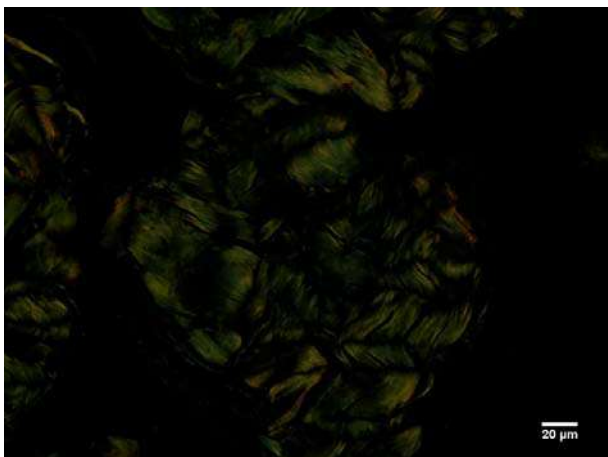
G



H



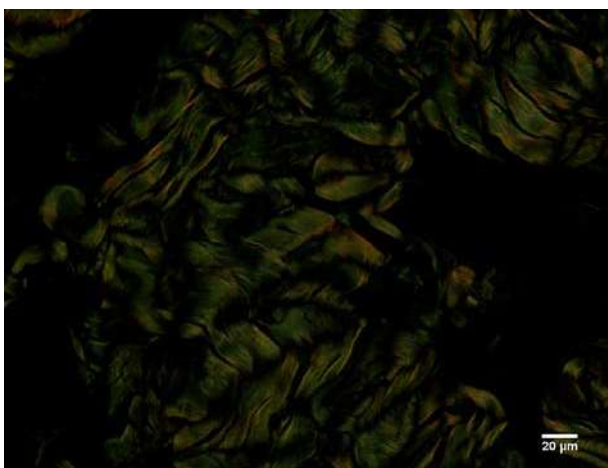
I



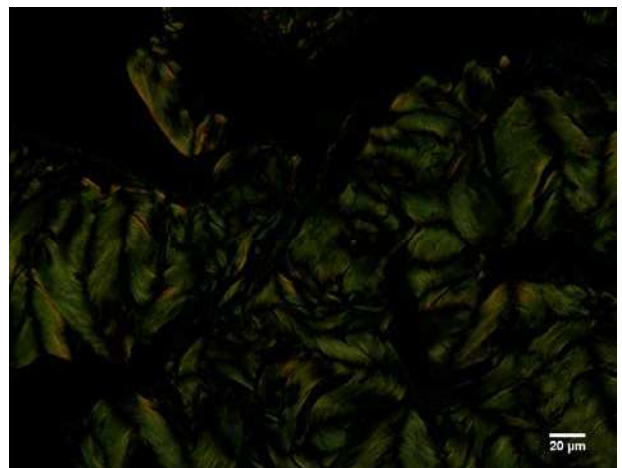
J



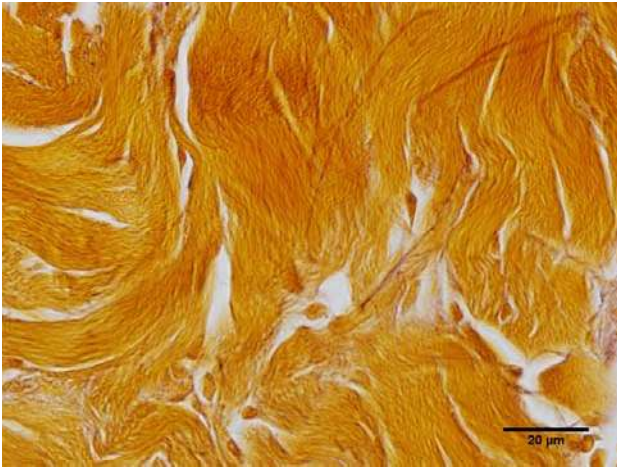
K



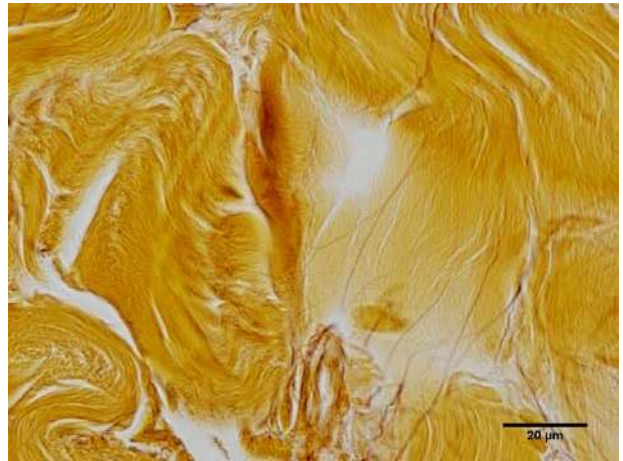
L



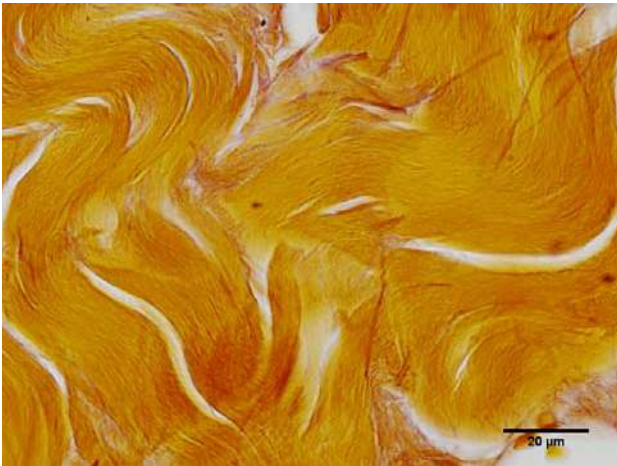
M



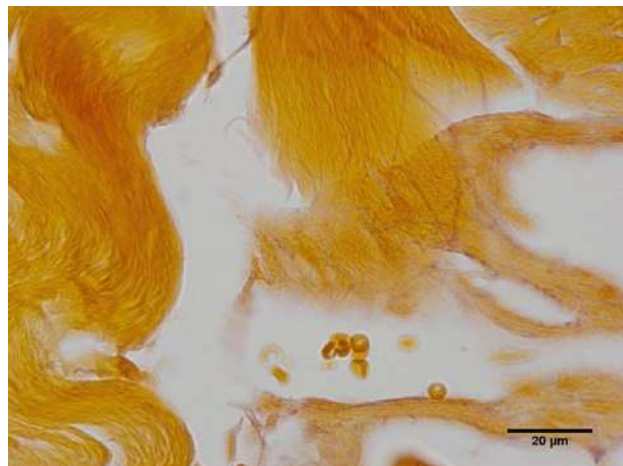
N



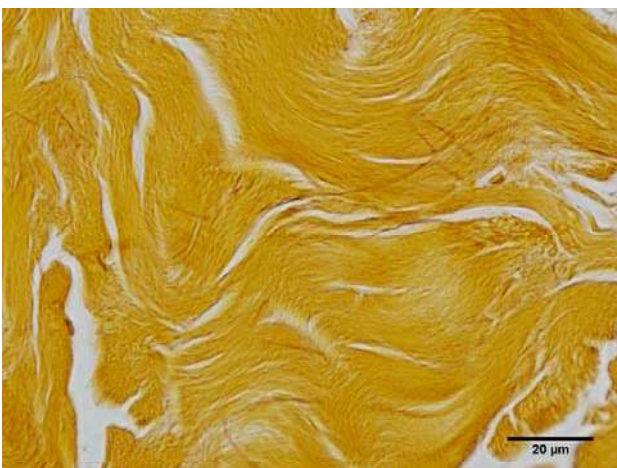
O



P



Q



R

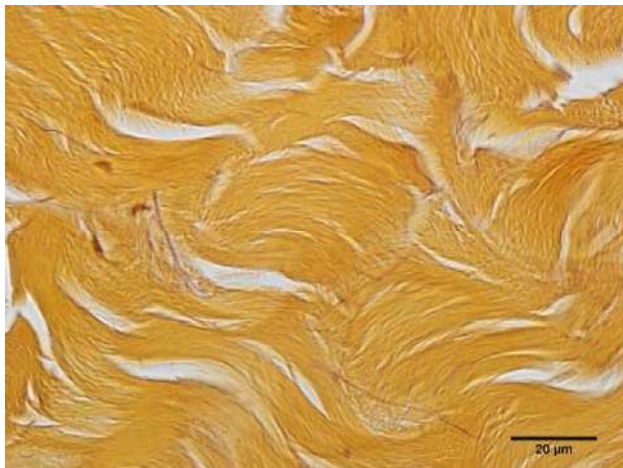


Table 1: Analysis of serum testosterone through the study.

Group	Time (days)						
	Day 0	Day 10	Day 20	Day 30	Day 40	Day 50	Day 60
Control group (ng/dL)	260.78 ± 89.35	253.60 ± 88.02	282.02 ± 81.60	282.02 ± 72.66	282.02 ± 97.62	242.52 ± 59.88	165.92 ± 29.83
	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 8)	(n = 8)	(n = 9)	(n = 9)
Orquiect + vehicle group (ng/dL)	335.57 ± 76.49	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00
	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)
Degarelix 200 group (ng/dL)	258.08 ± 84.58	154.65 ± 17.56	220.48 ± 55.42	190.02 ± 52.73	296.57 ± 96.36	202.96 ± 51.23	97,23 ± 26.58
	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 8)
Degarelix 400 group (ng/dL)	247.01 ± 90.67	128.28 ± 49.39	74.87 ± 20.64	85.54 ± 25.41	49.98 ± 10.71	43.21 ± 11.54	32.32 ± 7.00
	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)
Degarelix 600 group (ng/dL)	439.15 ± 150.64	65.28 ± 11.57	39.45 ± 13.43	32.97 ± 12.83	35.67 ± 10.18	29.94 ± 7.89	36.71 ± 11.28
	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 7)
Degarelix 800 group (ng/L)	249.15 ± 76.24	61.72 ± 12.93	45.60 ± 17.37	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	25.17 ±5.17
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)

* Means ± SEM

Acknowledgement:

Bel Motta is supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES*

We thank Urogenital Research Unit staff, UERJ, Clinical Analysis and Pathology laboratories (UFCSPA) for technical support and UFCSPA and CNPq (MCT/CNPq 14/2012) for financial support.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que alterações nas doses de degarelix, talvez entre 200 ug/kg e 400 ug/kg, sejam capazes gerar um estado hipogonádico em ratos. Além disso, mesmo em modelos com níveis de testosterona sérica de hipogonádicos não castrados foi possível observar um impacto significativo na estrutura do CC, o que sugere que o tratamento com degarelix seja capaz de produzir um modelo experimental de hipogonadismo e reforça a importância dos androgênios na manutenção da histomorfometria peniana em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREA, Carlos Eduardo de; BLEGGI-TORRES, Luiz Fernando; ALVES, Maria Teresa de Seixas. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, v.44, n.1, Feb. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442008000100010&lng=en&nrm=iso>.

AGERSO, H. *et al.* The dosing solution influence on the pharmacokinetics of degarelix, a new GnRH antagonist, after s.c. administration to beagle dogs. Eur J Pharm Sci, v.20, n. 3, p. 335-40, Nov. 2003.

AL HAYEK, A. A. *et al.* Prevalence of low testosterone levels in men with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. J Family Community, v.20, n. 3, p. 179-86, Sep. 2013.

ANDERSSON, K. E. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. J Urol, v. 170, n. 2, p. 6-13, Aug. 2003.

ARAUJO, A. B. *et al.* Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-age and older men: estimates from the massachusetts male aging study. J Clin Endocrinol Metab, v. 89, n. 12, p. 5920-6, Dec. 2004.

ARAUJO, A. B. *et al.* Prevalence of symptomatic androgen deficiency in men. J Clin Endocrinol Metab, v. 92, n. 11, p. 4241-7, Nov. 2007.

AYTA, I. A.; McKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. BJU Int, v. 84, n. 1, p. 50-6, Jul. 1999.

BHASIN, S. *et al.* Testosterone dose-response relationships in healthy young men. Am J Physiol Endocrinol Metab, v. 281, n. 6, p. 1172-81, Dec. 2001.

BHASIN, S.; WOODHOUSE, L.; STORER, T. W. Androgens effect on body composition. Growth Horm IGF Res, v. 13, suppl a:s63-71, Aug. 2003.

BHASIN, S. *et al.* Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab, v. 91, n. 6, p. 1995-2010, May. 2006.

BAKIRCIOGLU, M. E. *et al.* Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1 expression in the penile tissue of aged rats. J Urol, v. 166, n. 2, p. 734-738, Aug. 2001.

BANCROFT, J.; WU, F. C. Changes in erectile responsiveness during androgen replacement therapy. Arch Sex Behav, v. 12, n. 1, p. 59-66, Feb. 1983.

BOCCON-GIBOD, L.; VAN DER MEULEN, E.; PERSSON, B. E. An update on the use of gonadotropin-releasing hormone antagonists in prostate cancer. *Ther Adv Urol*, v.3, n.3, p. 127-40, Jun. 2011.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*, v. 331, n. 19, p. 1286-92, Nov. 1994.

BROQUA, P. *et al.* Pharmacological profile of a new, potent, and long-acting gonadotropin-releasing hormone antagonist: degarelix. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 301, n. 1, p. 95-102, Apr. 2002.

BURNETT, A. L. Nitric oxide in the penis science and therapeutic implications from erectile dysfunction to priapism. *J Sex Med*, v. 3, n. 4, p. 578-82, Jul. 2006.

CABRINI, M. R. *et al.* Fibrotic protein expression profiles in penile tissue of patients with erectile dysfunction. *Urology*, v. 82, n. 4, p. 975 e 1-6, Oct. 2006.

CALVI, E. N. *et al.* An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cir Bras*, v. 27, n. 10, p. 681-686, Oct. 2012.

CATTANACH, B. M. *et al.* Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature*, v. 269, p. 338-340, Sep. 1977.

CLARO, J. de A. *et al.* Histomorphometry of penile smooth muscle fiber in severe erectile dysfunction. *Sao Paulo Med J*, v. 123, n. 4, p. 181-186, Jul. 2005.

CELLEK, S. *et al.* Common pitfalls in some of the experimental studies in erectile function and dysfunction: a consensus article. *J Sex Med*, v. 9, n. 11, p. 2770-2784, Nov. 2012.

CHODAK, G. W. A critical review of maximal androgen blockade for advanced prostate cancer. *Rev Urol*, v. 6, Suppl 8, p. 18-23, 2004.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT. National Institutes of Health. Impotence. *Int J Impot Res*, v. 5, n. 4, p. 181-284, Dec. 1993.

COOK, T.; SHERIDAN, W. P. Development of GnRH antagonists for prostate cancer : new approaches to treatment. *Oncologist*, v. 5, n. 2, p. 162-8, 2000.

COSTA, W. S. *et al.* Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int*, v. 97, n. 3, p. 567-569, Mar. 2006.

DANDONA, P.; ROSENBERG, M. T. A practical guide to male hypogonadism in the primary care setting. *Int J Clin Pract*, v. 64, n. 6, p. 682-96, May. 2010.

EMIR, L. *et al.* Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: a minimally invasive method. *Urol Oncol*, v. 26, n. 4, p. 392-6, Jul-Aug. 2008.

EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY (EUA). Guidelines on prostate cancer. Apr, 2014. Disponivel em:

< http://www.uroweb.org/gls/pdf/09%20Prostate%20Cancer_LRLV2.pdf>

EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY (EUA). Guidelines on male hypogonadism. Apr, 2014. Disponivel em:

< http://www.uroweb.org/gls/pdf/09%20Prostate%20Cancer_LRLV2.pdf>

FERRANDO, A. A. *et al.* Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 282, n. 3, p. 601-7, Mar. 2002.

FIELD, A. E. *et al.* The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and hormone-binding globulin in middle-age men. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 79, n. 5, p. 1310-6, Nov. 1994.

GIULIANO, F. New horizons in erectile and endothelial dysfunction research and therapies. *Int J Impot Res*, v. Suppl 2:S2-8., Dec. 2008.

GOLDSTEIN, A. M. *et al.* New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology*, v. 20, n. 3, p. 259-66, Sep. 1982.

GOLDSTEIN, A. M. *et al.* The fibrous skeleton of the corpora cavernosa and its probable function in the mechanism of erection. *Br J Urol*, v. 57, n.5, p. 574-8, Oct. 1985.

GONZALEZ-CADAVID, N. F. *et al.* Expression of the androgen receptor gene in rat penile tissue and cells during sexual maturation. *Endocrinology*, v. 129, n. 3, p. 1671-8, Sep. 1991.

GOOREN, L. J.; SAAD, F. Recent insights into androgen action on the anatomical and physiological substrate of penile erection. *Asian J Androl*, v. 8, n. 1, p. 3-9, Jan. 2006.

GURBUZ, N; MAMMADOV, E.; USTA, M. F. Hypogonadism and erectile dysfunction: an overview. *Asian J Androl*, v. 10, n. 1, p. 36-43, Jan. 2008.

HAKAMATA, Y. *et al.* A new male hypogonadism mutant rat (hgn/hgn): concentrations of testosterone (T), luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) in the serum and the responsiveness of accessory sex organs to exogenous T, FSH, human chorionic gonadotropin, and luteinizing hormone-releasing hormone. *Biol Reprod*, v.38, n. 5, p. 1145-53, Jun. 1988.

HALMOS, G. *et al.* Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 6, p. 2398-402, Mar. 1996.

HENRIKSEN, N. A. *et al.* Connective tissue alteration in abdominal wall hernia. *Br J Surg*, v. 98, n. 2, p. 210-920, Feb. 2011.

HUGGINS, C.; STEVENS, R. E. JR; HODGES, C. V. Studies on prostate cancer. II. The effect of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. Arch Surg, v.43, p. 43:209-23, 1941.

HUHTANIEMI, I. Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment. Asian J Androl, v. 16, n. 2, p. 192-202, Mar. 2014.

HURT, K. J. *et al.* Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neural nitric oxide synthase mediates penile erection. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 109, n. 41, p. 16624-9, Oct. 2012.

ISIDORI, A. M. *et al.* Effects of testosterone on sexual function in men: results of a meta-analysis. Clin Endocrinol (Oxf), v. 63, n. 4, p. 381-94, Oct. 2005.

ISIDORI, A. M. *et al.* A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: from pathophysiology to treatment-a systematic review. Eur Urol, v. 65, n. 1, p. 99-112, Jan. 2014.

JANJIC, M. M. *et al.* Transient rise of serum testosterone level after single sildenafil treatment of adult male rats. J Sex Med, v. 9, n. 10, p. 2534-2543, Oct. 2012.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibres. J Cell Sci, v. 115, n. 14, p. 2817-28, Jul. 2002.

KIERNAN, J. A. **Histological and histochemical methods**: theory and practice . 3. Ed. London: Arnold, 2000.

KLOTZ, L. *et al.* Disease control outcomes from analysis of pooled individual patient data from five comparative randomized clinical trials of degarelix versus luteinizing hormone-releasing hormone agonists. Eur Urol, n. 13, p. 01491-7, Jan. 2014.

LAGODA, G. *et al.* Molecular analysis of erection regulatory factors in sickle cell disease associated priapism in the human penis. J Urol, v. 189, n. 2, p. 762-8, Feb. 2013.

LEE, Y. Androgen deficiency syndrome in older people. J Am Assoc Nurse Pract, v. 26, n. 4, p. 179-86 Apr. 2014.

LEJEUNE, H.; HUYGHE, É.; DROUPY, S. [Hypoactive sexual desire and testosterone deficiency in men]. Prog Urol, v. 23, n. 9, p. 621-8, Jul. 2013.

LEWIS, R. W. *et al.* Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. J Sex Med, v. 4 Pt 2, n. 7, p. 1598-607, Apr. 2010.

LIN, B. J. *et al.* The time for serum testosterone to reach castrate level after bilateral orchiectomy or oral estrogen in the management of metastatic prostatic cancer. Urology, v. 43, n. 6, p. 834-7, Jun. 1994.

LIN, J. S. *et al.* Age associated changes in collagen content and its subtypes within rat corpora cavernosa with computerized histomorphometric analysis. *Urology*, v. 57, n. 4, p. 837-42, Apr. 2001.

LUE, T. F. Erectile dysfunction. *N Engl J Med*, v. 342, n. 24, p. 1802-1813, Jun. 2000.

MAIA, R. S. *et al.* Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum, and túnica albuginea in the rabbit penis. *Int J Impot Res*, v. 18, n. 2, p. 121-125, Mar. 2006.

Mc LEOD, D. G. Antiandrogenic drugs. *Cancer*, v. 71, n. 3 Suppl, p. 1046-9, Feb. 1993.

MILLS, T. M.; WIEDMEIER, V. T.; STOPPER, V. S. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod*, v. 46, n. 3, p. 342-8, Mar. 1992.

MILLS, T. M.; REILLY, C. M.; LEWIS, R.W. Androgens and penile erection: a review. *J Androl*, v. 17, n. 6, p. 633-638, Nov-Dec. 1996.

MIRANDA, A. F. *et al.* Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. *J Androl*, v. 33, n. 6, p. 1224-32, Nov-Dec. 2012.

MONROE, A. K.; DOBS, A. S. The effect of androgens on lipids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, v. 20, n. 2, p. 132-9, Apr. 2013.

MORALES, A. *et al.* Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. *J Sex Med*, v. 1, n. 1, p. 69-81, Jul. 2004.

MULHALL, J. P. *et al.* Effect of testosterone supplementation on sexual function in hypogonadal men with erectile dysfunction. *Urology*, v. 63, n. 2, p. 348-52, Feb. 2004.

MULLIGAN, T. *et al.* Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *Int J Clin Pract*, v. 60, n. 7, p. 762-9, Jul. 2006.

NARDOZZA, J. A. *et al.* Age-related testosterone decline in a Brazilian cohort of healthy military men. *Int Braz J Urol*, v. 37, n. 5, p. 591-7, Sep-Oct. 2011.

NEHRA, A. *et al.* Systemic sclerosis and impotence: a clinicopathological correlation. *J Urol*, v. 153, n. 4, p. 1140-6, Apr. 1995.

NEHRA, A. *et al.* Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure. *J Urol*, v. 156, n. 4, p. 1320-1329, Oct. 1996.

NEHRA, A. *et al.* The Princeton III Consensus recommendations for the management of erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Mayo Clin Proc*, v. 87, n. 8, p. 766-78, Aug. 2012.

NORTON, P. A. Pelvic floor disorders: the role of fascia and ligaments. Clin Obstet Gynecol, v. 36, n. 4, p. 926-38, Dec. 1993.

ORFHEU, S. C. *et al.* Collagen and elastic content of abdominal skin after surgical weight loss. Obes Surg, v. 20, n. 4, p. 480-6, Apr. 2010.

PADUCH, D. A. *et al.* The laboratory diagnosis of testosterone deficiency. Urology, v. 83, n. 5, p. 980-8, May. 2014.

PANTALONE, K. M.; FAIMAN, C. Male hypogonadism: more than just a low testosterone. Cleve Clin J Med, v. 79, n. 10, p. 717-25, Oct. 2012.

PETAK, S. M. *et al.* American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hypogonadism in adult male patients—2002 update. Endocr Pract, v. 8, n. 6, p. 440-56, Nov-Dec. 2002.

PINHEIRO, A. C. *et al.* Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. J Urol, v. 164, n. 5, p. 1802-1806, Nov. 2000.

PHILLIPS, G. B.; JING, T.; HEYMSFIELD, S. B. Relationships in men of sex hormones, insulin, adiposity, and risk factors for myocardial infarction. Metabolism, v. 52, n. 6, p. 784-90, Jun. 2003.

PRIETO, D. Physiological regulation of penile arteries and veins. Int J Impot Res, v. 20, n. 1, p. 17-29, Jan-Feb. 2008.

PRINCIVALLE, M. *et al.* Rapid suppression of plasma testosterone levels and tumor growth in the dunning rat model treated with degarelix, a new gonadotropin-releasing hormone antagonist. J Pharmacol Exp Ther, v. 320, n. 3, p. 1113-8, Mar. 2007.

QUINLAN, D. M, *et al.* The rat as a model for the study of penile erection. J Urol., v. 141, p. 656-61, 1989.

REY, R. A. *et al.* Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach. Andrology, v. 1, n. 1, p. 3-16, Jan. 2013.

RICH, L; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. Braz. J. morphol. Sci., v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.

RHODEN, E. L. *et al.* The relationship of serum testosterone to erectile function in normal aging men. J Urol, v. 167, n. 4, p. 1745-8, Apr. 2002a.

RHODEN, E. L. *et al.* Is there any relation between serum levels of total testosterone and the severity of erectile dysfunction? Int J Impot Res, v. 14, n. 3, p. 167-71, Jun. 2002b.

RHODEN, E. L. *et al.* Diabetes mellitus is associated with subnormal serum levels of free testosterone in men. *BJU Int*, v. 96, n. 6, p. 867-70, Oct. 2005.

ROGERS, R. S. *et al.* Intracavernosal vascular endothelial growth factor (VEGF) injection and adeno-associated virus-mediated VEGF gene therapy prevent and reverse venogenic erectile dysfunction in rats. *Int J Impot Re*, v. 15, p. 26-37, 2003.

SATTAR, A. A.; WESPES, E.; SCHULMAN, C. C. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur Urol*, v. 25, n. 2, p. 142-4, 1994.

SEYEDREZA, P.; ALIREZA, M. N.; SEYEDEBRAHIM, H. Role of testosterone in memory impairment of alzheimer disease induced by streptozotocin in male rats. *Daru*, v. 20, n.1, p. 98, 2012.

SINGH, R. *et al.* Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology*, v. 144, n. 11, p. 5081-8, Nov. 2003.

SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. *Lancet*, v. 381, n. 9861, p. 153-165, Jan. 2013.

SHEN, Z. J. *et al.* Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian J Androl*, v. 5, n. 1, p. 33-36, Mar. 2003.

SHORES, M. M. *et al.* Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Inter Med*, v. 166, n. 15, p. 1660-5, Aug. 2006.

SHORES, M. M. *et al.* Testosterone treatment and mortality in men with low testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 97, n. 6, p. 2050-8, Jun. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA (SBU). Diretrizes de Câncer de Próstata. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < <http://www.sbu.org.br/?diretrizes> >.

SONESSON, A. *et al.* Metabolite profiles of degarelix, a new gonadotropin releasing hormone receptor antagonist, in rat, dog, and monkey. *Drug Metab Dispos*, v. 39, n. 10, p. 1895-903, Oct. 2011.

SUSAN, S. *et al.* **Grays Anatomy**: the anatomical basis of clinical practice. 40. ed. London: Elsevier, 2008.

SUZUKI, K. *et al.* Male hypogonadism as a candidate of deficiency of postnatal testicular growth or differentiating factor(s): a new autosomal recessive mutation in the rat. *J Hered*, v. 79, n. 1, p. 54-8, Jan-Feb. 1988.

TADDEI, S. *et al.* Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation*, v. 91, n. 7, p. 1981-7, Apr. 1995.

TAJAR, A. *et al.* characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95, n. 4, p. 1810-8, Apr. 2010.

TIEVA, A.; BERGH, A.; DAMBER, J. E. The clinical implications of the difference between castration, gonadotrophin releasing hormone (GnRH) antagonists and agonists treatment on the morphology and expression of GnRH receptors in the rat ventral prostate. *BJU Int*, v. 91, n. 3, p. 227-33, Feb. 2003.

TOMERA, K. *et al.* The gonadotropin-releasing hormone antagonist abarelix depot versus luteinizing hormone-releasing hormone agonists leuprolide or goserelin: initial results of endocrinological and biochemical efficacies in patients with prostate cancer. *J Urol*, v. 165, n. 5, p. 1585-9, May. 2001.

TRAISH, A. M. *et al.* Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology*, v. 140, n. 4, p. 1861-8, Apr. 1999.

TRAISH, A. M. *et al.* Adipocyte accumulation in penile corpus cavernosum of the orchiectomized rabbit: a potential mechanism for veno-occlusive dysfunction in androgen deficiency. *J Androl*, v. 26, n. 2, p. 242-8, Mar. 2005.

TRAISH, A. M. *et al.* Effects of medical or surgical castration on erectile function in an animal model. *J Androl*, v. 24, n. 3, p. 381-7, May. 2003.

TRAISH, A. M.; GUAY, A. T. Are androgens critical for penile erections in humans? Examining the clinical and preclinical evidence. *J Sex Med*, v. 3, n. 3, p. 382-404, May 2006.

TRAISH, A. M. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: a review. *J Androl*, v. 30, n. 4, p. 363-9, Jul-Aug. 2009.

TRAISH, A. M. *et al.* Testosterone deficiency. *Am J Med*, v. 124, n. 7, p. 578-87, Jul. 2011.

WANG, C. *et al.* Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA, and ASA recommendations. *J Androl*, v. 30, n. 1, p. 1-9, Jan-Feb. 2009.

WU, D.; GORE, A. C. Changes in androgen receptor, estrogen receptor alpha, and sexual behavior with aging and testosterone in male rats. *Horm Behav*, v. 58, n. 2, p. 306-16, Jul. 2010.

WU, F. C. *et al.* Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med*, v. 363, n. 2, p. 123-35, Jul. 2010.
middle-aged and elderly men.

ZARROUF, F. A. *et al.* Testosterone and depression: systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Pract*, v. 15, n. 4, p. 289-305, Jul. 2009.

**ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da
UFCSPA**

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 081/12

Parecer 126/12

2) DATA DO PARECER: 16/05/2012

3) TÍTULO DO PROJETO:

Desenvolvimento de um modelo de hipogonadismo em ratos e avaliação dos efeitos sobre o comportamento, alterações histológicas dos corpos cavernosos e próstata e níveis teciduais de diidrotestosterona tecidual prostática

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Ernani Luis Rhoden

5) RESUMO DO PROJETO:

A proposta de pesquisa pretende desenvolver um modelo de hipogonadismo através do bloqueio farmacológico ao receptor do hormônio gonadotrófico, impedindo seu efeito estimulante sobre a liberação de LH e, em última instância, de testosterona pelas células intersticiais dos testículos. Segundo os autores, se faz necessária a criação de uma nova forma de redução dos níveis androgênicos para mimetizar o hipogonadismo patológico.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Propor um modelo de hipergonadismo

7) FINALIDADE DO PROJETO:

☐ Ensino

☒ Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

☒ Adequado

☐ Comentários

Introdução

☒ Adequada

☐ Comentários

Objetivos

☒ Adequados

☐ Comentários

Relevância e Justificativa

☒ Adequados

☐ Comentários

Materiais e Métodos

☒

Adequados

☒

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

☒

Adequado

☐

Comentários

Orçamento e fonte financiadora

☒

Adequados

☐

Comentários

Referências Bibliográficas

☒

Adequadas

☐

Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒

Sim

☐

Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse:

B

|

C

☐

D

☒

E

☐

Justifique:

Espécie: Rattus norvegicus, cepa Wistar

Número Amostral:

60

Redução Amostral:

☐

Sim

☒

Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

☐

Sim

☒

Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

☐

Sim

☒

Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico

substituto:

Incluir no projeto exatamente o momento pós-cirúrgico da administração do Ibuprofeno. Há previsão de 3 administrações, mas não estão especificados os intervalos de administração.

Anestesia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico

substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia

substituto:

Local de Realização (Biotério/Laboratório):

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
Março de 2012 a			
Dezembro de 2013			

12) RECOMENDAÇÃO:

☒

Aprovado

☐

Com Pendência

☐

Não aprovado

ANEXO B - Normas do periódico *Journal Sexual of Medicine*



Author Guidelines

EDITOR-IN-CHIEF

Irwin Goldstein, MD
Director, Sexual Medicine
Alvarado Hospital
University of California
San Diego, CA USA
Email: dr.irvinggoldstein@gmail.com

EDITORIAL ASSISTANT

Sue W. Goldstein, AB
San Diego Sexual Medicine
San Diego, CA, USA
Address correspondence to the Editorial Office:

Jason Roberts, PhD
Managing Editor, *The Journal of Sexual Medicine (JSM)*
Donna Schena
Assistant Managing Editor, *The Journal of Sexual Medicine (JSM)*

36 Old Mill Lane
Plymouth, MA 02360, USA
Fax: (1) 508-242-1184
Phone: (1) 617-417-6269
Email: jsm@issm.info

SUBMISSION

The Journal of Sexual Medicine requires that authors submit electronically via the ScholarOne Manuscripts online submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/jsm>. Complete, detailed instructions on uploading your manuscript are detailed below.

First click on the "Check for Existing Account" button on the opening page of the website (the bottom of the two buttons). If you do not already have an account, then create an account for yourself by clicking on the "Create an Account" button. You will

then be able to submit and monitor the progress of your manuscripts. Follow the submittal instructions carefully.

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an E-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact the editorial office at ism@issm.info. Through individual Author Centers on this website, authors can view the status of their manuscripts as they progress through the review process.

Any major word processor software may be used, and both DOS-based and Macintosh operating systems are acceptable.

REFERRALS TO SEXUAL MEDICINE

The Journal of Sexual Medicine works together with the ISSM's new Open Access Journal, *Sexual Medicine*, to enable rapid publication of good quality research that we are unable to accept for publication in our journal. Authors, whose papers are rejected by *The Journal of Sexual Medicine*, may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editors of *Sexual Medicine*. Publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editors of *Sexual Medicine* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. *Sexual Medicine* is an Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to www.sm.issm.info. Please note that if you are an author or reviewer for *The Journal of Sexual Medicine*, you automatically have an account with *Sexual Medicine* and you should use the same login information for submission to that journal that you use for the other journal.

AIMS AND SCOPE

The Journal of Sexual Medicine publishes multidisciplinary basic science and clinical research to define and understand the scientific basis of male, female, and couple's sexual function and dysfunction. As an official journal of the International Society for Sexual Medicine and the International Society for the Study of Women's Sexual Health, it provides [HEALTHCARE](#) professionals in sexual medicine with essential educational content and promotes the exchange of scientific information generated from experimental and clinical research.

The Journal of Sexual Medicine includes basic science and clinical research studies in the psychologic and biologic aspects of male, female, and couple's sexual function and dysfunction, and highlights new observations and research, results with innovative treatments and all other topics relevant to clinical sexual medicine.

The objective of *The Journal of Sexual Medicine* is to serve as an interdisciplinary forum to integrate the exchange among disciplines concerned with the whole field of human sexuality. The journal accomplishes this objective by publishing original

articles, as well as other scientific and educational documents that support the mission of the International Society for Sexual Medicine.

International Society for Sexual Medicine Mission

Specifically, the ISSM aims:

- To establish a scientific Society to benefit the public by encouraging the highest standards of practice, education and research in the field of human sexuality;
- To develop and assist in developing scientific methods for the diagnosis, prevention and treatment of conditions affecting human sexual function;
- To promote the publication and encourage contributions to the medical and scientific literature in the field of sexual function.

MANUSCRIPT TYPES

The Journal of Sexual Medicine publishes several types of manuscripts. A brief description of each type follows:

- Original Research
- Reports and Brief Reports
- Reviews
- Editorials
- [CONTINUING MEDICAL EDUCATION](#)
- Calendar

Original Research

Original research papers are scientific reports from original research in sexual medicine. As a general guideline, manuscripts should be 3,000 words in length; more extensive manuscripts will be considered and judged on merit; however, authors are urged to be as concise as possible. All manuscripts must include an abstract, a maximum of 7 tables and figures (total), and up to 50 references. More may be accepted if justified.

GENERAL INSTRUCTIONS

Manuscripts must be submitted in grammatically correct English, with spelling and phrasing consistent throughout the paper. Manuscripts that do not meet this standard cannot be reviewed.

English-Language [EDITING SERVICES](#)

Authors for whom English is a second language may wish to consult an English-speaking colleague or consider having their manuscript professionally edited before

submission to improve the English. A list of independent suppliers of [EDITING SERVICES](#) can be found

at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Simultaneous Submission

A manuscript is considered for review and possible publication on the condition that it is submitted solely to *The Journal of Sexual Medicine*, and that the manuscript or a substantial portion of it is not under consideration elsewhere. In order for a manuscript to be considered for publication all named authors must agree 1) to its submission, 2) that it is not currently being considered for publication by another journal, and 3) if accepted, the paper will not subsequently be published in the same or similar form in any language without the written consent of the publisher.

Manuscript Structure

Each manuscript must contain the following structured headings:

- Abstract
- Introduction
- Aims
- Methods
- Main Outcome Measures
- Results
- Conclusions
- References

Reporting Checklists

It is **strongly recommended**, where appropriate, that you ensure your manuscript conforms to a reporting guideline that best [FITS](#) your type of manuscript. For example, a CONSORT statement should be completed and uploaded with your manuscript for a Randomized Controlled Trial. [The International Society for Sexual Medicine \(ISSM\) Publication Reporting Guidelines](#) detail the appropriate checklist(s) to use per study type.

We urge you when completing your reporting checklist to take the time to ensure your manuscript meets these basic reporting needs. In doing so, you will greatly enhance your chances of publication.

Statistical Guidelines

All submitted manuscripts containing data analyses will be evaluated for the integrity of the statistical methods as well as a sufficient description of the methodological

approach. This will entail evaluation of the study design, statistical analysis and presentation and interpretation of study results. As a general guideline, readers of the manuscript should be able to replicate the analysis with the same data based on the description given in the Methods section. Authors are encouraged to carefully select language in the Discussion that is appropriate given the study design and refrain from causal inferences from observational (nonrandomized) studies. Authors should also be explicit about the limitations of the study. Failure to disclose important limitations upon submission will be viewed with greater scrutiny than those clearly discussed. Key elements which should be consistent for all submitted manuscripts include the following:

- Report the sample size n for each study and each analysis
- Describe the power analysis to justify the sample size if appropriate
- Identify all statistical methods and verify the assumptions for all statistical tests
- Provide alpha (the probability of a Type I error) for all statistical tests
- Specify whether tests are one- or two-sided
- Report the descriptive statistics (n , mean, median, and standard deviation) for all continuous variables
- Report n and the sample proportion for binary variables
- Adequately explain complex statistical procedures such as multivariate logistic regression and the Cox proportional hazards regression model and verify the assumptions of each such procedure
- Report the actual P -values and explain what is meant by statistical significance
- Discuss and describe adjustments for multiple testing

Ethics

All manuscripts must conform to the policies outlined in the [ISSM Publication Guidelines](#).

Informed Consent

The Journal of Sexual Medicine requires that all appropriate steps be taken in obtaining informed consent of any and all human and/or experimental animal subjects participating in the research comprising the manuscript submitted for review and possible publication. A statement indicating that the protocol and procedures employed were reviewed and approved by the appropriate institutional review committee must be included in the Methods section of the manuscript. For research involving recombinant DNA, containment facilities and guidelines should conform to those of the National Institutes of Health or corresponding institutions. For those

investigators who do not have formal ethics review committees, the principles outlined in the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983, should be followed. A statement is required with any report of investigations involving human subjects confirming that informed consent was obtained from the subject(s) and/or guardian(s). It should be stated clearly in the manuscript that informed consent was obtained.

Disclosure Statement

The Journal of Sexual Medicine requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, which might be perceived as influencing an author's objectivity, is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in any ISSM journals. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to list on the cover letter to the Editor-in-Chief, in the manuscript (under the Acknowledgements section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Authors' Professional and Ethical Responsibilities

Should possible scientific misconduct or dishonesty in research submitted for review be suspected or alleged, *The Journal of Sexual Medicine* reserves the right to forward any submitted manuscript to the sponsoring or funding institution or to other appropriate authorities for investigation. The journal also screens manuscripts for incidents of plagiarism; please ensure that manuscripts present original data written in unique language.

Authorship

The Journal of Sexual Medicine requires that all authors complete an authorship statement. All [PERSONS](#) designated as authors should qualify for authorship. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. Authorship credit should be based only on substantial contributions to Category 1: a) conception and design, b) analysis of data, and c) interpretation of data; and Category 2: a) drafting the article, or b) revising it critically for important intellectual content; and on Category 3) final approval of the version to be published. Categories 1, 2, and 3 must all be met. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. General supervision of the research group is not sufficient for authorship. Any part of an article critical to its main conclusions must be the responsibility of at least one author.

Editors may ask authors to describe what each contributed; this information may be published. Increasingly, multicenter trials are attributed to a corporate author. All members of the group who are named as authors, either in the authorship position below the title or in a footnote, should fully meet the above criteria for authorship. Group members who do not meet these criteria should be listed, with their permission, in the Acknowledgments or in an appendix. The order of authorship should be a joint decision of the coauthors. Because the order is assigned in different ways, its meaning cannot be inferred accurately unless it is stated by the authors. Authors may wish to explain the order of authorship in a footnote. In deciding on the order, authors should be aware that many journals limit the number of authors listed in the table of contents and that the U.S. National Library of Medicine (NLM) lists in MEDLINE only the first 24 plus the last author when there are more than 25 authors.

Drugs and Devices

Use of generic drug names (or generic name followed by trade name in parentheses) may be used. Include manufacturer and their location (city and country) for drugs and devices.

Permissions

Information reproduced from another source must be properly cited. The corresponding author is responsible for obtaining written permission from the appropriate authors and/or copyright holders to use previously published or copyrighted material. Signed permission statements from the copyright holder for both print and online reproduction must be sent to *The Journal of Sexual Medicine* Editorial Office upon manuscript submission. Permission statements also must be obtained from at least one author when citing unpublished data, in press articles, and/or [PERSONAL](#) communications.

MANUSCRIPT PREPARATION AND SUBMISSION

In general, manuscripts should be prepared in accordance with “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” developed by the International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org).

We place few restrictions on the way in which you prepare your article, and it is not necessary to try to replicate the layout of the journal in your submission. We ask only that you consider your reviewers by supplying your manuscript in a clear, generic and readable layout, and ensure that all relevant sections are included. Our production process will take care of all aspects of formatting and style.

Please use the [Manuscript Submission Checklist](#) at the end of the Author Guidelines to ensure that the manuscript has all the information necessary for successful publication.

Abstracts

Abstracts must be submitted in the appropriate field without the manuscript title or factors identifying the authors or institutions. Abstracts have a 300 word limit.

Abstracts must be structured to include introduction, aim, methods, main outcome measures, results and conclusions.

Keywords

Below the abstract authors should provide, and identify as such, 4 to 10 key words or short phrases that will assist indexers in cross-indexing the article and may be published with the abstract. Terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of Index Medicus should be used; if suitable MeSH terms are not yet available for recently introduced terms, present terms may be used.

References

References are to be cited consecutively in the text typed after the final punctuation. References at the end of each manuscript should be listed in the order in which they are first cited in the text, typed double-spaced. The references should conform to the Index Medicus style, omitting number and day of month of issue. Punctuation is shown in the examples below. References to articles in press must state name of journal and if possible, volume and year.

For journal articles: all authors should be listed, title of article; name of journal; year; volume number; first and last page.

For [BOOKS](#): surname and initials of all authors, title and subtitle, edition (other than first), publishing house, city, year, page as specific reference.

For chapters in [BOOKS](#): surname and initials of all authors of chapter, title of chapter, editors, authors, or compilers of [BOOK](#), title of book, edition (other than first), publishing house, city, year, page.

1. Jones, TH, Smith, ML, Land SW. Diagnosis and treatment of [ERECTILE DYSFUNCTION](#). J Urol 1986;135:922-927.

2. King, RE. Sexual dysfunction in men and women. Taylor and Francis: Philadelphia 1974, 86pp.

3. Stevens RA, Otis PN. Persistent sexual arousal syndrome. In: Johnson DA, ed. Female sexual dysfunction.. Little Brown and Company: Boston, 1976, pp 100-106.

Abbreviations, Symbols, and Nomenclature

A list of acceptable abbreviations is published in the Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals (also known as the Declaration of Vancouver). For more information, refer to: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Intern Med 1997;126:36-47. You may contact the Editor or publisher directly with questions.

Quantitative data must be reported in the International System of Units (SI units).

Tables and Figures - House Style Guidelines

All tables and figures must be original for original research. If a table or figure has been published before, written permission must be given by the owner for its reproduction.

Tables

All tables must be cited in the text in the order that they should appear. Tables should

be typed double-spaced on separate pages with number and title. Symbols for units should be confined to column headings. Tables must be supplied in an editable format. It is not acceptable to supply tables as images. You will be asked to resupply any table submitted in a non-editable format.

Figures

All figures must be cited in the text in the order that they should appear. Illustrations are an important medium through which to convey the meaning in your article, and there is no substitute for preparing these to the highest possible standard. Therefore, please create your illustrations carefully with reference to our graphics guidelines (see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>). It is very difficult to improve an image that has been saved or created in an inappropriate format. We realize that not everyone has access to high-end graphics software, so the following information may help if you are having difficulty in deciding how to get the best out of the tools at your disposal.

1. Check your software options to see if you can 'save as' or 'export' using one of the robust, industry-standard formats. These are:

- Encapsulated PostScript (EPS)
- Tagged Image File Format (TIFF)
- Portable Network Graphics (PNG)
- Portable Document Format (PDF)

2. As a general rule of thumb, images that contain text and line art (graphs, charts, maps, etc.) will reproduce best if saved as EPS or PDF. If you choose this option, it is important to remember to embed fonts. This ensures that any text reproduces exactly as you intend.

3. Images that contain photographic information are best saved as TIFF or PNG, as this ensures that all data are included in the file. JPEG (Joint Photographic Experts Group) should be avoided if possible, as information is lost during compression; however, it is acceptable for purely photographic subjects if the image was generated as a JPEG from the outset (many digital cameras, for example, output only in JPEG format).

4. If you are not sure which format would be the best option, it is always best to default to EPS or PDF as these are more likely to preserve the high-quality characteristics of the original.

5. Microsoft Office. If you have generated your images in Microsoft Office software (Word, Excel, PowerPoint), or similar, it is often best simply to send us the files in their native file formats.

6. Please ensure all images are a minimum of 600 dpi.

Supporting Information

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but

ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format.

For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>.

REVIEW PROCESS

Editorial and Peer Review Process

The Journal of Sexual Medicine maintains the highest standards of peer review and pursues editorial approaches that may help us avoid bias. All submitted manuscripts are reviewed for quality, novelty, scientific importance, and relevance to the journal's readership. Manuscripts with insufficient priority for publication or those that are outside the scope of the journal are rejected promptly, or, if appropriate, referred to *Sexual Medicine*. Manuscripts are assigned to an Associate Editor, who is a subject expert. Associate Editors select the external peer reviewers who are experts in the field, and submit a recommendation to the Editor-in-Chief along with the peer review reports. The Editor-in-Chief makes all final decisions on manuscripts. All research articles published in the journal undergo full peer review. We do our utmost to judge research objectively on its own merits and to avoid favoring research, for example, from particular institutions, countries, or regions. *The Journal of Sexual Medicine* employs a double-blind review process in which author identities and peer reviewer identities are kept confidential from one another. All publication decisions are made by the Editor-in-Chief on the basis of the reviews provided. Members of the Editorial Board lend insight, advice, and guidance to the Editor-in-Chief generally and assist in decision making on specific submissions. The Managing Editor and Editorial Assistant provide administrative support to ensure the journal maintains the integrity of peer review and delivers rapid and efficient publication to authors and reviewers. The existence of a manuscript under review is not revealed to anyone other than the peer reviewers and editorial staff. Peer reviewers are required to maintain confidentiality about the manuscripts they review and must not divulge any information about a specific manuscript or its content to any third party without prior permission from the journal editors. All authors will be sent notification of the receipt of manuscripts and editorial decisions by e-mail. During the review process, designated contact authors can also check the status of the submitted manuscript via ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jsm>.

Information for Peer Reviewers

As per the guidelines issued by the World Association of Medical Editors (for further information, refer to www.WAME.org):

“Reviews will be expected to be professional, honest, courteous, prompt, and constructive. The desired major elements of a high-quality review should be as follows:

- The reviewer should have identified and commented on major strengths and weaknesses of study design and methodology.
- The reviewer should comment accurately and constructively upon the quality of the author's interpretation of the data, including acknowledgment of its limitations.
- The reviewer should comment on major strengths and weaknesses of the manuscript as a written communication, independent of the design, methodology, results, and interpretation of the study.
- The reviewer should comment on any ethical concerns raised by the study, or any possible evidence of low standards of scientific conduct.
- The reviewer should provide the author with useful suggestions for improvement of the manuscript.
- The reviewer's comments to the author should be constructive and professional.
- The review should provide the editor the proper context and perspective to make a decision on acceptance (and/or revision) of the manuscript.”

Recommendations about publication are appreciated and are welcomed in the comments to the Editors. However, we kindly ask that reviewers not make such recommendations in their comments to the authors. Indeed, it is our policy to edit such comments out of any communications to authors.

CrossCheck

CrossCheck is a multi-publisher initiative to screen published and submitted content for originality. To find out more about CrossCheck visit <http://www.crossref.org/crosscheck.html>. By submitting your manuscript to *The Journal of Sexual Medicine* you accept that your manuscript may be screened, using the iThenticate tool, for textual similarity to other previously published works.

COPYRIGHT TRANSFER

Authors will be required to assign copyright in their papers. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. The copyright transfer agreement form is available [here](#).

PRODUCTION PROCESS

Proofs

Soon after acceptance, you will receive an email containing your PDF proof. The

corresponding author must return all proof corrections within 48 hours and limit changes to corrections of typographical errors and errors in the presentation of data. Once you have submitted your corrections, the production office will finalize the layout of your article for publication.

Reprints

Authors will receive instructions on how to purchase reprints inside their proof packets. Please note that regardless of the form in which they are received, reprints should not be resold, nor further disseminated in electronic form, nor deployed in part or in whole in any marking, promotional, or educational contexts without authorization from Wiley.

Production Questions

Please direct any questions regarding the production of your article to the Production Editor at JSM@wiley.com.

Author Resources

For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for *The Journal of Sexual Medicine* authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts, and Customized Research Tools.

Embargo Policy

Once submitted, contributions cannot be discussed with the media until one week before the publication date. Accepted articles are embargoed from reporting by all media until 12:01 A.M. (EST) on the date of issue. Authors who discuss their work with the media prior to publication must ensure that the media representatives know the embargo policy and the embargo date. Authors arranging their own publicity on their articles are advised to notify *The Journal of Sexual Medicine* Editorial Office in advance. The Journal of Sexual Medicine does not provide embargo dates to authors arranging their own publicity.

SELF-ARCHIVING

Following publication of the final published version, the author retains the right to self-archive the submitted version on the author's [PERSONAL](#) website or in the author's institution's/employer's institutional repository or archive. This right extends to both intranets and the Internet. Authors may not self-archive on 3rd-party repositories. Authors may not update the submitted version or replace it with the published version. The version posted must contain a legend as follows: This is the pre-peer-reviewed version of the following article: FULL CITE, which has been published in final form at [Link to final article]. Please see the Copyright Transfer Agreement for additional details on author rights.

NIH PUBLIC ACCESS MANDATE

The Journal of Sexual Medicine fully complies with the NIH public access mandate. For those interested in the Wiley policy on the NIH Public Access Mandate, please [visit our policy statement](#).

GETTING HELP

If you need additional help, please contact the Managing Editor at jsm@issm.info.

Manuscript Submission Checklist

Please complete the following steps to ensure the correct submission of your manuscript:

- Include a title page for your manuscript that is separate from the rest of the main document (preferably uploaded as a Supplementary File Not for Review), including:
 - Full author names and the highest qualifications (PhD, MD, etc.) for all authors;
 - Institution, city and country details for each author; and,
 - Address of corresponding author (especially email address for the [PERSON](#) to whom the proof notification is to be sent).
- Please upload the main manuscript without identifying author information, including:
 - Title page WITHOUT authors' names or authors' affiliations
 - Abstract and 4–10 keywords
 - Text (introduction, materials and methods, results, discussion)
 - Literature cited (see below for tips on references)
 - Tables (may be sent as a separate file if necessary)
 - Figure legends
 - Acknowledgements, including details of funding bodies with grant numbers
- Abstracts for Original Research articles must be structured as follows: Introduction, Aims, Methods, Main Outcome Measures, Results, Conclusion.
- Abstracts for Case Reports should be structured as follows: Introduction, Aims, Methods, Results, Conclusion.
- Provide a conflict of interest statement for every author.
- Please pay attention to the quality of all figures and artwork supplied (see below for requirements):
 - All charts must be in black and white or grayscale.
 - Should your figures originate in a PowerPoint presentation, please remove: any previous presentation effects, such as line-art color that is not of didactic value; background color or shading effects and 3-dimensional views where 2-d can convey results with equal effectiveness.
 - All text included in figure labels must be of a sufficient size to be legible should the figure be resized during typesetting.

- Do not include the figure title or figure identification number within the figure itself. This does not reproduce effectively and typically does not [FIT](#) journal style.
- Please save your figure files at the highest resolution possible. Please also supply figure art in original file formats whenever possible. Images imbedded in a MS Word document typically do not possess a resolution as high as the original file.
- Have all scientific symbols used in your manuscript transferred successfully to the PDF proof? Please correct this problem before submission.
- All references must be displayed sequentially based upon order of citation. References ordered alphabetically are not acceptable. Failure to comply with, or perform, these important tasks may delay both peer-review of your manuscript and its eventual publication.

REPRODUCTION PERMISSION

You can obtain permission to reproduce *The Journal of Sexual Medicine* content directly from the journal's website. Just search for the material you wish to reuse on [Wiley Online Library](#). Click on the 'Request Permission' link.

- Follow the online instructions and select your requirements from the drop down options to gain a 'quick quote'
- Create a RightsLink® account to complete and pay for your transaction (if you do not already have one)
- Read and accept our Terms & Conditions and Download your license

COMMUNICATIONS TO THE PUBLISHER

For business inquiries, subscription information, orders, or subscriber [CHANGES OF ADDRESS](#), and all other information visit: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1743-6109/homepage/Contact.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1743-6109/homepage/Contact.html).