

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

Graziele Halmenschlager

**Alterações Histomorfométricas e Grau
de Apoptose no Corpo Cavernoso de
Ratos em Deprivação Androgênica
Submetidos ou Não a Reposição
Hormonal com Testosterona**

UFCSPA

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

Porto Alegre

2013

Graziele Halmenschlager

Alterações Histomorfométricas e Grau de Apoptose no Corpo Cavernoso de Ratos em Deprivação Androgênica Submetidos ou Não a Reposição Hormonal com Testosterona

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

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

Porto Alegre
2013

Catalogação na Publicação

Halmenschlager, Grazielle

Alterações histomorfométricas e grau de apoptose no corpo cavernoso de ratos em deprivação androgênica submetidos ou não a reposição hormonal com testosterona / Grazielle Halmenschlager. -- 2013.

128 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

Orientador(a): Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden.

1. Histologia. 2. Histomorfometria. 3. Hipogonadismo. 4. Reposição Hormonal. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Para o meu pai, Jorge Halmenschlager (*in memorian*),

Por toda sua dedicação e trabalho

Por todo o seu amor e carinho

Por todo o seu ensinamento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, **Jorge Halmenschlager**, por todo incentivo dado para que eu pudesse concluir meus estudos. Agradeço a ele pela paciência, pela educação que eu recebi, pelo amor, pelo carinho e por todos os momentos felizes que passamos juntos. É uma honra ser sua filha e me orgulho muito de ter convivido com você todos estes anos. Você sempre estará presente no meu coração, eternamente. TE AMO.

À minha mãe, **MarliseT. Halmenschlager**, que nunca mediu esforços para que eu realizasse meus sonhos. Obrigada pelo incentivo, pelo imenso apoio e por ter acreditado sempre em mim. Te amo.

À minha irmã **Viviane**, que, mesmo de tão longe, sempre me apoiou. Obrigada Vivi, te amo.

Ao **Rafael**, pelo apoio e por ter ficado com o meu bem mais precioso quando não pude estar presente: o Thiago.

Ao meu filho, **Thiago**, por ter compreendido e cedido o seu tempo para que eu pudesse concluir o doutorado. Filho: você sempre será minha grande motivação, inspiração, minha luz e meu bem mais precioso, eternamente. Obrigada pelo simples fato de existir na minha vida e torná-la muito melhor.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden**, que me conduz, de forma brilhante e incansável, pelo caminho da deslumbrante ciência há aproximadamente 6 anos. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, pela confiança, pelo apoio e pela oportunidade.

À **Profa. Dra. Cláudia Ramos Rhoden**, “a mãeeeeee” do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica. Obrigada pelo apoio, pela confiança, pelo carinho, pelo respeito, pelos ensinamentos e, principalmente, pela amizade.

Aos meus amigos do **Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica**. Obrigada por todo o carinho, pelo apoio, pela descontração e pela amizade. Quero agradecer a **cada um** dos integrantes deste maravilhoso grupo: OBRIGADA. Porém, não poderia deixar de agradecer, em especial, a **Gabriela Almeida Motta**, por ter me “aguentado” este tempo todo como iniciação científica e agora como aluna de mestrado. Obrigada Gabi, por TODA ajuda que você me deu neste tempo todo. Sem você, muita coisa não teria acontecido. Agradeço, também, ao amigo **Lucas Sagrillo Fagundes**, que muita “orquiectomia” me ajudou a fazer. Obrigada.

À toda equipe do **Laboratório de Pesquisa em Patologia**, da UFCSPA, em especial à **Teresinha Stein**, por todo apoio e por toda ajuda que recebi durante esta etapa da minha vida. Grande parte deste trabalho ocorreu devido à ajuda desta maravilhosa profissional. Obrigada “Terê” por tudo!!

Ao **Prof. Dr. Francisco Sampaio** e ao **Prof. Dr. Waldemar Costa**, por terem me recebido de maneira tão calorosa no Laboratório de Pesquisa Urogenital, da UERJ.

Aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa Urogenital, da UERJ: **Diogo Benchimol de Souza, Bruno Felix Patrício, Jorge Medeiros Jr., Bianca Gregório, Raquel e Carina**. Obrigada por terem SEMPRE me recebido de braços abertos, fazendo com que eu me sentisse sempre em casa, sempre à vontade. Obrigada Diogo, Bruno e Jorge, pelos valiosos ensinamentos. Sem o conhecimento transmitido por vocês, com certeza esta tese não teria sido concluída.

Agradeço, imensamente, à Raquel e Carina, que sempre me cederam o cantinho da cama para dormir enquanto estive no Rio de Janeiro. Jamais esquecerei vocês e o que fizeram por mim.

À **Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**, por disponibilizar recursos para que o trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos, por todo o apoio que recebo, recebi e receberei. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES* – pelo incentivo dado durante toda a execução do trabalho.

À FAPERGS, pela disponibilização de recursos financeiros para a realização desta pesquisa.

*“Do not follow where the path may lead.
Go instead where there is no path and leave a trail”.*

Muriel Strode

RESUMO

A fisiologia da ereção envolve mecanismos centrais e periféricos complexos. Contudo, para que os fenômenos envolvidos na função erétil se estabeleçam de maneira adequada, há a necessidade da integridade dos tecidos dos corpos cavernosos, bem como de um nível adequado de hormônios e neurotransmissores. Ainda, níveis adequados de testosterona atuam na anatomia do corpo cavernoso, na fisiologia e na função do tecido peniano, bem como regulam a liberação de óxido nítrico. Porém, o exato mecanismo pelo qual a testosterona atua no corpo cavernoso permanece incerto. Portanto, o objetivo desta tese foi avaliar os efeitos histomorfométricos e o grau de apoptose no corpo cavernoso de ratos submetidos à ablação androgênica, com ou sem reposição hormonal com undecanoato de testosterona. Para tanto, ratos Wistar adultos foram divididos em três grupos: Grupo 1= *Sham operation* (n=5-8); Grupo 2 = Orquiectomia bilateral + veículo oleoso 30 dias após a cirurgia (n = 7 – 8) e Grupo 3 = Orquiectomia bilateral + Undecanoato de testosterona 100mg/kg, via i.m., 30 dias após a cirurgia (n=5-7). Todos os animais foram sacrificados 60 dias após o início dos experimentos. Observamos uma diminuição nos níveis de testosterona no Grupo 2 quando comparado aos Grupos 1 e 3 ($P<0,001$). A ablação androgênica diminuiu tanto o diâmetro peniano bem como a quantidade de musculatura lisa no corpo cavernoso ($P=0,001$; $P=0,005$, respectivamente) e a reposição hormonal manteve estes parâmetros a níveis de animais controle. Nenhuma diferença foi encontrada na quantidade de espaços sinusóides ($P=0,207$), fibras elásticas ($P= 0,849$), fibras colágenas ($P=0,216$), grau de apoptose celular ($P=0,095$) e óxido nítrico entre os grupos ($P=0,526$). Concluímos que níveis adequados de testosterona mantêm a quantidade de musculatura lisa no corpo cavernoso e que este andrógeno não influencia na quantidade de fibras elásticas e fibras colágenas no corpo cavernoso de ratos. Além disso, a testosterona não altera a taxa de apoptose no corpo cavernoso bem como os níveis de óxido nítrico.

Palavras-chave: análise histomorfométrica, orquiectomia bilateral, undecanoato de testosterona, reposição hormonal, apoptose, óxido nítrico, ablação androgênica.

ABSTRACT

Erectile function physiology is a complex interplay between central and peripheral mechanisms. However, for the erectile mechanism to be set appropriately, it requires the integrity of corpora cavernosa tissue, as well as adequate levels of hormone and neurotransmitters. Furthermore, adequate levels of testosterone are important to corpus cavernosum anatomy, to the physiology and function of penile tissue and regulate the release of nitric oxide. However, the exact mechanism by which testosterone acts in corpus cavernosum remains unclear. Therefore, the aim of this thesis was to evaluate histomorphometric parameters and apoptosis` degree in the corpus cavernosum of rats undergoing androgen ablation, with or without hormone replacement with testosterone undecanoate. Adult Wistar rats were divided into three groups: Group 1= *Sham operation* group (n= 5-8); Group 2=Bilateral orchiectomy + oily vehicle group (n= 7-8); Group 3= Bilateral Orchiectomy + testosterone undecanoate 100mg/kg i.m. 30 days after the surgery (n= 5-7).All animals were euthanized 60 days after the beginning of the treatment. Testosterone levels were decreased in Group 2 when compare to Groups 1 and 3 ($P<0.001$). Testosterone deprivation reduced trabecular smooth muscle content and penile diameter and testosterone replacement smooth muscle content as well as penile diameter ($P=0.005$; $P=0.001$, respectively). No difference was observed in the content of sinusoidal space ($P=0.207$), elastic fibers ($P=0.849$), collagen ($P=0.216$), apoptosis ($P=0.095$) and in NO levels among groups ($P=0.526$). Therefore, we conclude that testosterone levels maintain corpus cavernosum smooth muscle content and do not influence elastic fibers, collagen content as well as apoptotic index and NO levels.

Key-words: histomorphometry analysis; bilateral orchiectomy, testosterone undecanoate; testosterone replacement, apoptosis; nitric oxide; androgen deprivation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 MORFOLOGIA DO PÊNIS.....	15
1.1.2 Anatomia	15
1.1.3 Histologia do corpo cavernoso.....	17
1.1.4 Anatomia do pênis de rato.....	18
1.2 FISIOLÓGIA DA EREÇÃO.....	19
1.2.1 Aspectos Históricos.	19
1.2.2 Fisiologia da Ereção e o papel de neurotransmissores envolvidos neste processo	20
1.2.3 Disfunção Erétil (DE)	27
1.2.3.1 Definição e dados epidemiológicos	27
1.2.3.2 Fisiopatologia da DE	28
1.2.3.2.1 DE psicogênica	28
1.2.3.2.2 DE orgânica	28
1.2.3.2.2.1 Neurogênica	28
1.2.3.2.2.2 DE de origem vascular.....	29
1.2.3.2.2.3 DE induzida por drogas.....	31
1.2.3.2.2.4 DE induzida por doenças crônicas e estilo de vida	31
1.2.3.2.2.5 DE causada por problemas hormonais	31
1.3 FISIOLÓGIA HORMONAL MASCULINA	33
1.3.1 Testosterona.....	33
1.3.1.1 Síntese.....	33
1.3.1.2 Distribuição e metabolismo	35
1.3.1.3 Mecanismo de ação e efeitos biológicos	36
1.3.1.3.1 Regulação hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.....	37
1.3.1.3.2 Efeitos da testosterona sobre a função e disfunção erétil.....	40
2. JUSTIFICATIVA	46
3. OBJETIVOS DO ESTUDO	47
4. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	48
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	93
7. PERSPECTIVAS.	94
8. REFERÊNCIAS	95
9. ANEXOS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho de um corte transversal do pênis humano, demonstrando os capilares intracavernosos e a orientação das fibras na túnica albugínea.	18
Figura 2 – Corte transversal do pênis do rato Wistar, demonstrando as estruturas eréteis	19
Figura 3 – Processo de formação do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	21
Figura 4 – Mecanismos moleculares de relaxamento da musculatura lisa no corpo cavernoso.....	23
Figura 5 – Mecanismo fisiológico da função erétil, em: A) estado flácido, onde a musculatura lisa encontra-se contraída e B) estado ereto, onde a musculatura lisa está relaxada.....	24
Figura 6 – Mecanismo molecular de contração da musculatura lisa no corpo cavernoso.....	26
Figura 7 – Estrutura química da Testosterona.....	33
Figura 8– Mecanismos de controle da androgênese	34
Figura 9– Conversão da testosterona em metabólitos ativos	36
Figura 10 – Controle hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gônadas	40

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β -HSD	3 β -hidroxiesteróide dehidrogenase
AA	Ácido Araquidônico
Ach	Acetilcolina
AKT	Proteína Serina/Treonina Quinase (Proteinoquinase B)
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Cálcio
cGMP	Monofosfato Cíclico de Guanosina
DAG	Diacilglicerol
DE	Disfunção Erétil
DHT	Diidrotestosterona
E2	Estradiol
eNOS	Óxido Nítrico Sintetase endotelial
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GMP	Monofosfato Guanosina
GnRH	Hormônio Liberador das Gonadotrofinas
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzível
IP ₃	Inositol Trifosfato
LH	Hormônio Luteinizante
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i> – Cadeia Pesada de Miosina
MMAS	<i>Massachusetts Male Aging Study</i>
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
nNOS	Óxido Nítrico Sintetase neuronal
NO	Óxido Nítrico
Noe	Noradrenalina
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
O ₂	Oxigênio Molecular
P450c17	17- α hidroxilase/G17-20 liase
P450scc	Enzima citocromo-P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol

PDE-5	Fosfodiesterase tipo 5
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PI3-quinase	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP ₂	Bifosfato de Fosfatidilinositol
PKA	Proteinoquinase A
PKC	Proteinoquinase C
PKG	Proteinoquinase G
SHBG	Globulina de Ligação dos Hormônios Sexuais
StAR	Proteína de Regulação Aguda da Esteroidogênese
T	Testosterona
TCF-4	Fator de Transcrição Celular 4
TGF- β1	Fator de Crescimento Beta 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morfologia do Pênis

1.1.2 Anatomia

O pênis é o órgão masculino que comporta tanto o sistema urinário quanto o sistema reprodutor, devido à presença da uretra: saída comum para a urina e o sêmen (MOORE; DALLEY; AGUR; 2011). Anatomicamente, o pênis é composto por raiz, corpo e glândula. A raiz é a parte fixa do pênis localizada no períneo, entre a membrana do mesmo, na porção superior, e a fáscia, na porção inferior. É formada pelos ramos e pelo bulbo, que são massas de tecido erétil, bem como pelos músculos isquiocavernoso e bulboesponjoso (HEALY, 2008; MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*, 2012). O corpo do pênis, por sua vez, é a parte livre e pendular do mesmo, composto por dois corpos cavernosos, localizados na parte dorsal do pênis, e um corpo esponjoso, situado ventralmente. Tanto os corpos cavernosos quanto o corpo esponjoso são corpos cilíndricos de tecido erétil, sendo continuações dos ramos e do bulbo, respectivamente (HEALY *et al.*, 2008; MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*, 2012).

O septo do pênis, em geral, incompleto, separa os corpos cavernosos. Envolvendo cada corpo cavernoso, existe uma camada de revestimento externa fibroelástica densa denominada túnica albugínea (ROSS; PAWLINA; 2012). Além deste revestimento, os corpos cavernosos e o corpo esponjoso estão revestidos pela fáscia profunda do pênis, também denominada fáscia de Buck, o qual une estas estruturas (HEALY *et al.*, 2008; MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*, 2012). Sobrepondo a fáscia de Buck, encontramos a fáscia superficial, também

conhecida como fáscia Dartos (CHUNG *et al.*, 2012). O corpo esponjoso, por sua vez, abriga a parte esponjosa da uretra e se expande, na porção distal, para dar origem à glândula do pênis (HEALY *et al.*, 2008; MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*, 2012).

Toda esta estrutura é irrigada pelas artérias dorsais do pênis, pelas artérias profundas e pelas artérias do bulbo. As artérias dorsais são responsáveis pela irrigação do tecido fibroso localizado ao redor dos corpos cavernosos bem como pela irrigação do corpo esponjoso, da parte esponjosa da uretra e pele do pênis. Já as artérias profundas irrigam o tecido erétil do corpo cavernoso, sendo extremamente importantes no processo de ereção. As artérias do bulbo do pênis irrigam tanto a glândula bulbouretral quanto a parte posterior do corpo esponjoso e a uretra (HEALY *et al.*, 2008; MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*, 2012). Todas estas artérias são ramos das artérias pudendas internas (LUE, 2012).

A drenagem venosa é feita por um conjunto de veias que se une à veia dorsal profunda do pênis, levando a maior parte do sangue venoso dos corpos cavernosos e do corpo esponjoso para o plexo venoso prostático. Além disso, o sangue da pele e da tela subcutânea do pênis drena para a veia dorsal superficial, que, por sua vez, drena para a veia pudenda externa superficial (HEALY *et al.*, 2008; MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*, 2012).

O pênis é um órgão rico em terminações nervosas sensitivas, especialmente a glândula. O nervo dorsal do pênis, localizado lateralmente à artéria dorsal, conduz fibras sensitivas para a pele e para a glândula. Ainda, ramos do nervo ilioinguinal inervam a pele na raiz do pênis e os nervos cavernosos, responsáveis pela condução de fibras colinérgicas e adrenérgicas, inervam as artérias helicinas do tecido erétil (HEALY *et al.*, 2008; MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*,

2012). As fibras parassimpáticas (colinérgicas) têm origem na região S2-4 da medula espinhal, enquanto as fibras simpáticas (adrenérgicas) têm origem na região T11-L2 da medula espinhal (HEALY *et al.*, 2008).

Todo o órgão é envolvido por pele fina, sendo que a mesma está frouxamente aderida à fáscia do pênis pelo tecido conjuntivo frouxo subjacente, exceto na glândula, onde a mesma encontra-se fortemente aderida (MOORE; DALLEY; AGUR; 2011; CHUNG *et al.*, 2012; ROSS; PAWLINA; 2012).

1.1.3 Histologia do corpo cavernoso

O tecido erétil dos corpos cavernosos é formado por espaços vasculares amplos, de formato irregular, que são separados por trabéculas. Tais espaços vasculares são denominados sinusóides. As trabéculas são formadas por uma camada irregular de músculo liso, por fibras colágenas e por fibras do sistema elástico (JUNQUEIRA; CARNEIRO; 2008; LUE, 2012; ROSS; PAWLINA; 2012).

A túnica albugínea que envolve os corpos cavernosos é formada por uma rede de fibras elásticas e colágenas, que permite flexibilidade e rigidez durante a ereção (LUE, 2012; ROSS; PAWLINA; 2012). Esta estrutura contém 2 camadas que são formadas por múltiplas subcamadas. A camada interna é formada por fibras de orientação circular e é a partir desta camada que pilares intracavernosos têm origem, entrecruzando o tecido erétil, dando sustentação e suporte ao mesmo (LUE, 2012). Já a camada externa é formada por fibras na orientação longitudinal (LUE, 2012) (Figura 1).

Todas estas estruturas participam e são de suma importância para a função erétil (SHABSIGH, 1997; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009).

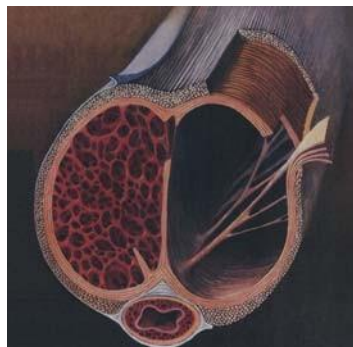


Figura 1 –Desenho de um corte transversal do pênis humano, demonstrando os capilares intracavernosos e a orientação das fibras na túnica albugínea (Reproduzido com permissão deElsevier.LUE, Tom Fin: WEIN et al. Campbell-Walsh Urology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2012. p. 55 – 70; Copyright Elsevier).

1.1.4 Anatomia do pênis de rato

O pênis do rato é um órgão amplamente utilizado para estudar a fisiologia da função erétil, bem como a fisiopatologia da disfunção erétil (DE). Além disso, é usado para estudar a estrutura histológica do corpo cavernoso e suas alterações frente a uma determinada patologia (PINHEIRO *et al.*, 2000). Devemos ressaltar, no entanto, que existem diferenças importantes na anatomia e na histologia do corpo cavernoso entre a espécie humana e o *Rattus norvegicus* (PINHEIRO *et al.*, 2000).

O primeiro ponto a ser considerado é que o roedor apresenta corpo cavernoso em formato de ferradura, como demonstrado na Figura 2. Apesar do septo do pênis ser incompleto na espécie humana, o mesmo mantém os corpos cavernosos separados, já que situam-se lado a lado (LUE, 2012).

Outra diferença importante entre o corpo cavernoso de ratos e de humanos se refere às características morfológicas/histológicas dos corpos cavernosos. Neste contexto, Pinheiro e colaboradores (2000) publicaram um artigo inédito cujo objetivo era caracterizar e quantificar a quantidade de músculo liso, de fibras colágenas e

fibras elásticas no corpo cavernoso de ratos e estabelecer um paralelo entre estes dados com aqueles encontrados em seres humanos (PINHEIRO *et al.*, 2000).

Segundo os autores, o corpo cavernoso de ratos apresenta menor quantidade de musculatura lisa e maior quantidade de colágeno, prevalecendo as fibras de colágeno do tipo I e III. Além disso, ratos possuem menor quantidade de fibras elásticas no corpo cavernoso (4,9%) quando comparado à humanos (9%) (PINHEIRO *et al.*, 2000). Vale ressaltar que o principal componente do corpo cavernoso de ratos são as fibras colágenas, como observado na Figura 2 (PINHEIRO *et al.*, 2000).

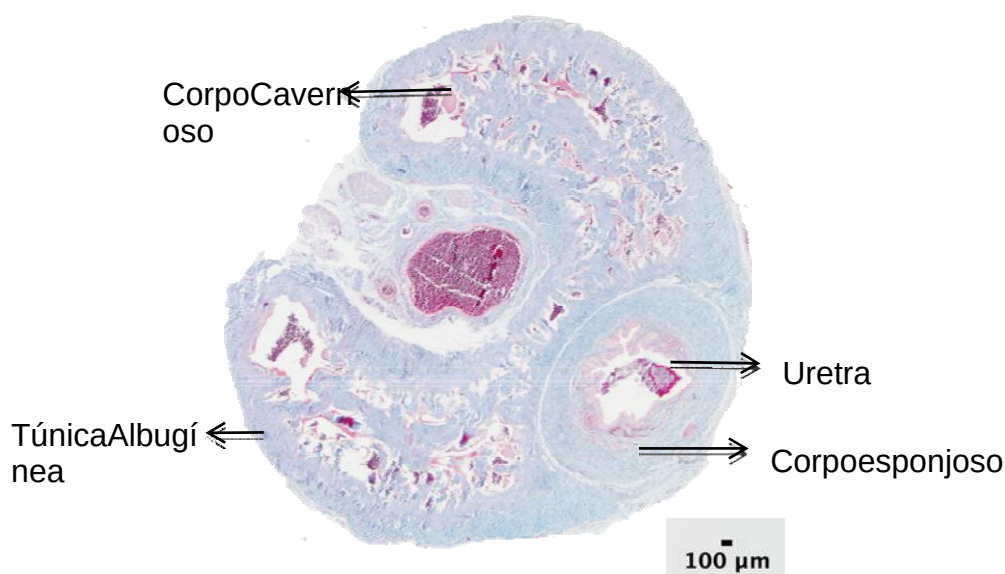


Figura 2 – Corte transversal do pênis de rato Wistar demonstrando as estruturas eréteis. Tricrômico de Azan, aumento de 20X (Arquivo pessoal).

1.2 Fisiologia da Ereção

1.2.1 Aspectos Históricos

A fisiologia da ereção tem sido alvo de interesse e estudo durante muito tempo. Uma das primeiras teorias sobre o assunto foi proposta por Aristóteles, o qual afirmou que o pênis era formado por nervos que carregavam energia ao mesmo

e que a ereção seria o resultado do influxo de ar neste órgão (LUE, 2012). Esta teoria foi bem aceita até que, em 1504, Leonardo da Vinci notou que o pênis ereto de um homem estava repleto de sangue, desmistificando a teoria proposta por Aristóteles (LUE, 2012). Em 1585, Ambroise Paré descreveu a anatomia peniana, bem como o conceito de ereção. Já em 1718, Dionis enfatizou a importância do fluxo sanguíneo para o mecanismo fisiológico da ereção. Desde então, muitas teorias acerca da hemodinâmica da ereção e da detumescência peniana foram descritas. Porém, foi apenas por volta das décadas de 80 e 90 que a maioria das descobertas sobre a fisiologia da ereção, tais como a importância da musculatura lisa e da túnica albugínea neste processo, bem como a identificação do óxido nítrico (NO) como o principal mediador da ereção, foram apresentadas (LUE, 2012).

1.2.2 Fisiologia da Ereção e o papel de neurotransmissores envolvidos neste processo

Sabe-se que a ereção peniana é o resultado de um complexo conjunto de eventos coordenados que envolve a participação tanto de fatores psicológicos, quanto hormonais e neurovasculares (LUE, 2000; BILLUPS, 2005). Após um estímulo sexual, as fibras parassimpáticas dos nervos cavernosos e o endotélio peniano liberam NO, o principal neurotransmissor envolvido na fisiologia da ereção (LUE, 2000; BURNETT, 2004; BILLUPS, 2005; LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

O NO é sintetizado tanto nas terminações nervosas dos nervos cavernosos quanto no endotélio vascular do corpo cavernoso, a partir do aminoácido precursor L-arginina e do oxigênio molecular (O₂) na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH). Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico-

sintetase (NOS) e forma dois compostos: a L-citrulina, a qual sofrerá ação da enzima arginina sintetase, formando novamente L-arginina; e o NO (BURNETT, 2004; GHALAYINI, 2004; GIULIANO, 2008) (Figura 3).

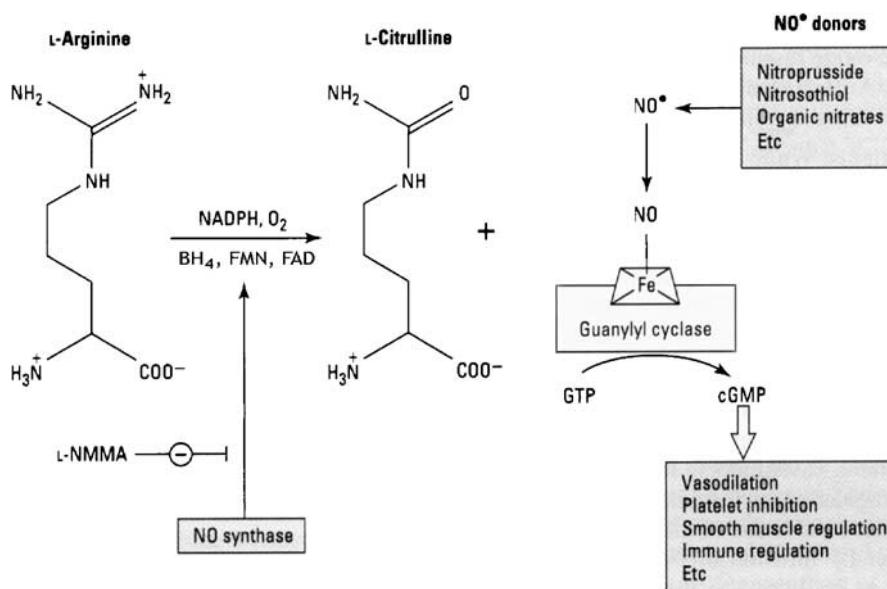


Figura 3- Processo de formação do óxido nítrico a partir da L-arginina (Reproduzido com permissão de Macmillan Publishers Ltd;GHALAYINI, Ibrahim F. Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. International Journal of Impotence Research, v. 16, p. 459 – 469, 2004; Copyright Nature Publishing Group).

Existem pelo menos 3 isoformas na enzima NOS: duas constitutivas, a NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS) e uma liberada durante processos inflamatórios e infecciosos, a NOS induzível (iNOS). As duas formas constitutivas da NOS, a nNOS e a eNOS, são dependentes do complexo Ca²⁺-calmodulina para sua ativação. A nNOS é ativada em resposta a uma despolarização de membrana, a partir de um impulso nervoso, e a eNOS pela estimulação da acetilcolina (Ach) bem como da substância P no endotélio vascular (BURNETT, 2004; GHALAYINI, 2004; GIULIANO, 2008). Contudo, é importante ressaltar que o estresse por cisalhamento, provocado pelo tracionamento de sangue contra o endotélio vascular do corpo cavernoso, também ativa a eNOS, através da ativação da fosfatidilinositol-3-quinase

(PI3-quinase), com consequente ativação da via serina/treonina proteinoquinaseB (Akt) (BURNETT, 2004). Esta via de sinalização, por sua vez, fosforila a eNOS, tornando a enzima ativa e reduzindo a necessidade de Ca^{2+} para ativação deste processo (BURNETT, 2004).

Logo após sua formação e liberação, o NO difunde-se para a musculatura lisa das trabéculas bem como para a musculatura lisa vascular do corpo cavernoso, promovendo relaxamento da musculatura lisa (ANDERSSON, 2003).

Este relaxamento ocorre através da ativação da enzima guanililciclase, o qual, por sua vez, aumenta a formação e a concentração intracelular de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (LUE, 2000; BURNETT, 2004; BILLUPS, 2005, CASTELA *et al.*, 2011; GUYTON; HALL; 2011; LUE, 2012). O cGMP, então, estimula uma proteínoquinase cGMP-dependente, a proteínoquinase G (PKG), a qual fosforila e inativa a miosinoquinase, causando relaxamento da musculatura lisa (LUE, 2000; BURNETT, 2004; BILLUPS, 2005; LUE, 2012). Além disso, tanto o cGMP quanto a PKG, podem ativar a abertura de canais de potássio levando, consequentemente, a uma hiperpolarização da membrana das fibras musculares lisas (LUE, 2000; LUE, 2012). Além deste mecanismo, o cGMP e a PKG podem promover a diminuição da concentração de cálcio intracelular tanto por inibir canais de cálcio voltagem-dependentes, quanto por aumentar a captura de cálcio intracelular pelo retículo endoplasmático, contribuindo, assim, para o relaxamento da musculatura lisa (LUE, 2000; CASTELA *et al.*, 2011; LUE, 2012) (Figura 4).

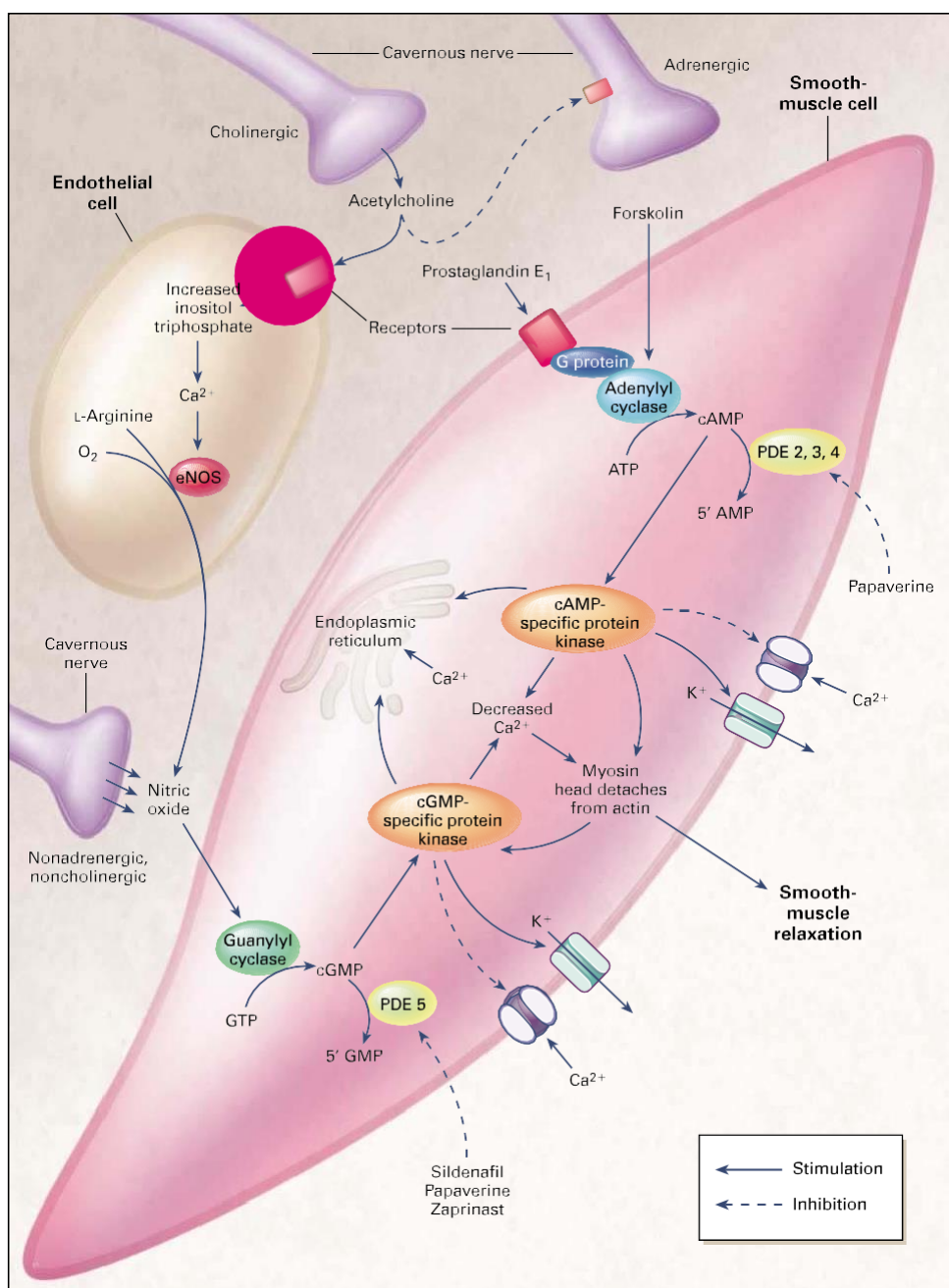


Figura 4 – Mecanismos moleculares de relaxamento da musculatura lisa no corpo cavernoso (Reproduzido com permissão de The New England Journal of Medicine. LUE, Tom F. Erectile Dysfunction. The New England Journal of Medicine, v. 342, nº 24, p. 1802 – 1813, Jun. 2000; Copyright Massachusetts Medical Society).

Apesar do NO ser considerado e reconhecido como o principal mediador envolvido no processo de ereção, a Ach também exerce seu efeito, embora de

maneira indireta, ao inibir a liberação de noradrenalina (Noe) a partir do terminal adrenérgico, e por aumentar a liberação de NO a partir do endotélio (LUE, 2012).

O relaxamento da musculatura lisa vascular permite com que haja dilatação de artérias e arteríolas do corpo cavernoso, o qual, por sua vez, aumenta o fluxo sanguíneo local. Além disso, o relaxamento da musculatura lisa das trabéculas permite a distensão do espaço sinusoidal, permitindo com que o mesmo se preencha com sangue, aumentando, assim, a pressão intracavernosa. Este aumento de pressão faz com que o plexo venoso, responsável pela drenagem venosa e localizado sob a túnica albugínea, fique comprimido, resultando, assim, na diminuição da saída de sangue e ao consequente acúmulo de sangue nos corpos cavernosos, resultando em ereção (LUE, 2012). Este processo hemodinâmico é conhecido como mecanismo de veno-oclusão e é extremamente importante para manutenção da ereção (CASTELA *et al.*, 2011). Neste contexto, devemos destacar a importância das propriedades fibroelásticas que a túnica albugínea possui para uma função veno-oclusiva normal (TRAISH, 2009)(Figura 5).

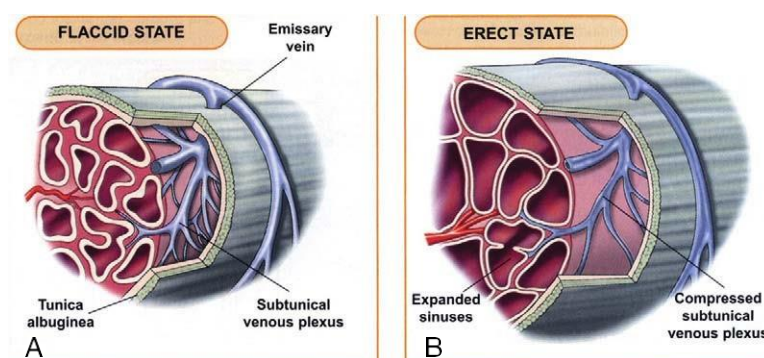


Figura 5 – Mecanismo fisiológico da função erétil, em: A) estado flácido, onde a musculatura lisa encontra-se contraída e B) estado ereto, onde a musculatura lisa está relaxada (Reproduzido com permissão de Elsevier.LUE, Tom F. In: WEIN *et al.* Campbell-WalshUrology. 10thed. Philadelphia, Pennsylvania: ElsevierSaunders, 2012. p. 688 – 720; Copyright Elsevier).

Além disso, estudos recentes demonstram que a nNOS possui um papel importante para o início da tumescência e a eNOS, ativada pelo estresse por cisalhamento após o aumento da pressão intracavernosa, é importante para a manutenção da ereção (ANDERSSON, 2003; BURNETT, 2004; GIULIANO, 2008).

Em contrapartida, a detumescência peniana é resultado tanto da conversão de cGMP em monofosfatoguanosina (GMP) pela enzima fosfodiesterase-5 (PDE-5), diminuindo, assim, as concentrações de cGMP, quanto pelo aumento da liberação de noradrenalina após a ejaculação, que resulta em contração da musculatura lisa do corpo cavernoso (LUE, 2000; LUE, 2012).

Sabe-se que o estado flácido do pênis é mantido por um tônus simpático e pela liberação de substâncias constritoras, tais como a endotelina-1, a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), o neuropeptídeo Y e a angiotensina II (ANDERSSON, 2003; LUE, 2012). Embora não se conheça o papel exato da $PGF_{2\alpha}$, do neuropeptídeo Y e da angiotensina II na manutenção do estado flácido do pênis, há diversas evidências científicas consolidando a Noe e a endotelina-1 como os principais mediadores envolvidos neste processo (ANDERSSON, 2003; LUE, 2012).

A liberação de Noe estimula receptores α_1 -adrenérgicos pós-sinápticos tanto na musculatura lisa do corpo cavernoso quanto nos vasos sanguíneos que irrigam esta estrutura (ANDERSSON, 2003; LUE, 2012). Após a ligação da Noe no receptor, ocorre a ativação da fosfolipase C, a qual, por sua vez, cliva o bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) em dois segundos mensageiros: o inositol trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). O IP_3 ativará receptores IP_3 específicos no retículo endoplasmático, promovendo a liberação e o aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) (ANDERSSON, 2003; LUE, 2012). Este Ca^{2+} intracelular se ligará à calmodulina, ativando, assim, a miosinoquinase. Esta enzima, por sua vez, fosforilaa

1.2.3 Disfunção Erétil (DE)

1.2.3.1 Definição e dados epidemiológicos

Em 1992, o *The Consensus Panel on Impotence of National Institute of Health* dos Estados Unidos introduziu o termo disfunção erétil (DE) para caracterizar a condição clínica na qual o homem apresenta uma inabilidade persistente em obter e/ou manter uma ereção suficiente para completar o ato sexual de forma satisfatória (NIH, 1993).

Esta patologia é um distúrbio médico comum que acomete pacientes acima de 40 anos de idade (SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Segundo dados do *Massachusetts Male Aging Study* (MMAS), um estudo que envolveu 1290 homens com idades entre 40 e 70 anos de idade nos arredores de Boston, Estado de Massachussets, nos Estados Unidos, aproximadamente 52% dos homens apresentavam algum grau de DE. Esta condição estratificada por intensidade demonstrou que 10% deste grupo de homens apresentavam DE severa, 25% moderada e 17% leve (FELDMAN *et al.*, 1994). Além disso, um nítido aumento com relação à idade foi estabelecido, sendo a DE estatisticamente mais frequente em indivíduos mais idosos (FELDMAN *et al.*, 1994). Estudos sequenciais de incidência, avaliada entre os anos de 1995 e 1997, demonstraram 25,9 casos novos/ano/1000 homens e que esta incidência apresentava também uma maior ocorrência de acordo com as diferentes décadas de vida, sendo de 12,4/1000, 29,8/1000 e 46,4/1000 na 4ª, 5ª e 6ª décadas, respectivamente (JOHANNES *et al.*, 2000).

No Brasil, estudos apontam que, de um total de 2.862 homens pesquisados, 45,1% deles possuem algum grau desta patologia (ABDO *et al.*, 2006). Cálculos de projeções revelam que, para o ano de 2015, esta patologia atingirá, aproximadamente, 322 milhões de homens no mundo, um aumento de mais de 170

milhões de casos (AYTAÇ *et al.*, 1999). Estes dados claramente revelam que a DE é e deve ser considerada um problema de saúde pública, especialmente para uma população que envelhece saudável (SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

1.2.3.2 Fisiopatologia da DE

A DE é uma doença multifatorial e pode ser classificada em: psicogênica, orgânica e mista (LUE, 2000; BILLUPS, 2005, LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Dentre as causas mencionadas acima, a mais comum é a de natureza mista, que envolve tanto fatores psicológicos quanto orgânicos (LUE, 2000; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

1.2.3.2.1 DE psicogênica

Entre as causas mais comuns de DE psicogênica está a ansiedade de performance, a qual está relacionada com medo de falhar no momento da relação sexual (LUE, 2000; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Contudo, a DE de origem psicológica envolve processos mais complexos, tais como problemas emocionais e de relacionamento interpessoal, bem como doenças psiquiátricas como depressão e esquizofrenia (LUE, 2000; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

Acredita-se que distúrbios psicológicos aumentem a secreção de catecolaminas na corrente circulatória, evitando, assim, o relaxamento desta musculatura (LUE, 2012).

1.2.3.2.2 DE orgânica

1.2.3.2.2.1 Neurogênica

A fisiologia da ereção é basicamente um evento neurovascular. Portanto, qualquer enfermidade e/ou trauma que acometa o encéfalo, a medula espinhal, os

nervos cavernosos e os receptores presentes tanto nas arteríolas quanto na musculatura lisa dos corpos cavernosos pode desencadear a DE (LUE, 2012).

Pacientes com esclerose múltipla, epilepsia no lobo temporal, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, trauma cerebral, acidente vascular cerebral e lesões na medula espinhal frequentemente apresentam algum grau de DE (LUE, 2000; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

Procedimentos cirúrgicos na região pélvica, como prostatectomia radical, geralmente tem como consequência a DE (LUE, 2000; LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

1.2.3.2.2.2 DE de origem vascular

A insuficiência arterial peniana é o produto final da DE de origem vascular. Diversos fatores de risco estão claramente envolvidos neste processo, tais como aterosclerose, hipertensão, dislipidemias, diabetes mellitus, obesidade, tabagismo e irradiação pélvica (LUE, 2000; LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Além disso, muitos destes fatores são comuns ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

Recentes estudos têm demonstrado que a DE está intimamente relacionada com o aumento na incidência de doenças cardiovasculares, assim como é um forte preditor das mesmas (ARAUJO *et al.*, 2010; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Alguns autores sugerem, ainda, que a DE deve ser considerada um marcador subclínico de uma doença cardiovascular não diagnosticada (BILLUPS, 2005). Neste contexto, Kloner *et al.* (2003) observaram que cerca de 75% dos pacientes portadores de doença coronariana crônica possuem algum grau de DE e, dentre estes, 25% apresentam DE severa. Embora se desconheça o mecanismo exato pelo qual a DE

prediz a ocorrência de um evento cardiovascular, sabe-se que a disfunção endotelial é o principal fator fisiopatológico que conecta as duas condições clínicas (BILLUPS, 2005; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

A disfunção endotelial é resultado da perda da integridade estrutural do endotélio, que culmina na perda da capacidade responsiva e secretora deste tecido (GIULIANO, 2008; CASTELA *et al.*, 2011). Desta forma, há uma redução na atividade da eNOS. Por conseguinte, há uma diminuição na formação de NO e perda da capacidade de relaxamento da musculatura lisa peniana, desencadeando o processo de DE (BILLUPS, 2005; GIULIANO, 2008; CASTELA *et al.*, 2011).

Além da disfunção endotelial, a disfunção veno-oclusiva é considerada uma das causas mais importantes e comuns de DE de origem vascular (LUE, 2000; LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Alterações tais como degeneração da túnica albugínea, como as que ocorrem na doença de Peyronie, no envelhecimento e na diabetes mellitus; trauma e alterações na microestrutura do corpo cavernoso, tais como diminuição na quantidade de fibras elásticas, de musculatura lisa, de endotélio, além do aumento de deposição de fibras colágenas, podem levar ao escape venoso, comprometendo a função erétil adequada (LUE, 2000; LUE, 2012). Além disso, o relaxamento inadequado da musculatura lisa compromete a expansão adequada dos sinusóides, também desencadeando disfunção veno-oclusiva, por falha na compressão do plexo venoso localizado sob a túnica albugínea (LUE, 2000; LUE, 2012). Este relaxamento inadequado da musculatura lisa do corpo cavernoso se deve à diminuição da liberação de NO, tal como ocorre na disfunção endotelial, bem como pelo aumento da atividade simpática em indivíduos com transtorno de ansiedade (LUE, 2000; LUE, 2012).

1.2.3.2.2.3 DE induzida por drogas

Diversas classes farmacológicas têm como efeitos adversos importantes a DE (LUE, 2000; LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Os antidepressivos, bem como anti-hipertensivos, estão entre as classes farmacológicas que mais desencadeiam DE (LUE, 2000; LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Podemos citar ainda drogas de abuso, tais como cocaína e maconha. Álcool e tabagismo também podem desenvolver DE em usuários (SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

1.2.3.2.2.4 DE induzida por doenças crônicas e estilo de vida

A DE pode ser consequência de diversas doenças, tais como diabetes mellitus, hipertensão, dislipidemia, aterosclerose, insuficiência renal crônica, obesidade e síndrome metabólica. Além disso, pode ser resultado de um estilo de vida sedentário (LUE, 2000; LUE, 2012; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Entretanto, o envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento de DE (SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência de DE aumenta conforme o envelhecimento da população, atingindo de 1 a 10% de homens abaixo de 40 anos de idade, 2 a 9%; entre 40 e 49 anos de idade, 20 a 40%; entre 60 e 69 anos de idade, e em homens acima de 70 anos de idade, a prevalência desta disfunção pode chegar até 100% (AYTAÇ *et al.*, 1999; JOHANNES *et al.*, 2000; ABDO *et al.*, 2006; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

1.2.3.2.2.5 DE causada por problemas hormonais

Sabe-se que níveis adequados de testosterona (T) sérica são importantes para a fisiologia da ereção, bem como para a libido e ereções noturnas (MILLS *et*

al.,1996; SHABSIGH, 1997; LUE, 2000; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009; SHAMLOUL; GHANEM; 2013). Embora evidências clínicas demonstrem que níveis subfisiológicos de T estejam associados com a DE (GURBUZ *et al.*, 2008), o mecanismo exato pelo qual os andrógenos exercem seus efeitos na função e disfunção erétil permanece sob intensa investigação (TRAISH *et al.*, 1999; TRAISH *et al.*, 2003; TRAISH, 2009).

Além da T, sabe-se que níveis elevados de prolactina podem interferir na função erétil (LUE, 2000; SHAMLOUL; GHANEM; 2013).

Os efeitos da T na função e disfunção erétil será detalhada posteriormente, em sessão apropriada.

1.3 Fisiologia hormonal masculina

1.3.1 Testosterona

1.3.1.1 Síntese

A testosterona é o principal andrógeno produzido pelo homem, sintetizado e secretado pelas células intersticiais de Leydig, nos testículos, sob o controle estimulatório do hormônio luteinizante (LH) (GNESSI *et al.*, 1997; ANDERSON; BAIRD; 2002; DONG; HARDY; 2004; BHASIN, 2008; GUYTON; HALL; 2011; SNYDER, 2012) (Figura 7).

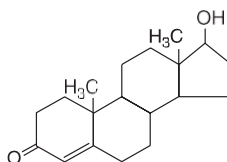


Figura 7–Estrutura química da Testosterona (Reproduzido com permissão de Elsevier.TUREK, Paul J. In: WEIN *et al.* Campbell-Walsh Urology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2012. p. 591 – 615; Copyright Elsevier).

O LH estimula a produção de testosterona ao se ligar em receptores acoplados à proteína G estimulatória presentes na membrana das células de Leydig. A ativação da proteína G aumenta a atividade da adenilato ciclase, enzima responsável pela conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (PAYNE; YOUNGBLOOD; 1995; WINTERS; DALKIN; 2004). O aumento da concentração de AMPc no ambiente intracelular ativa a proteinoquinase A (PKA), a qual, por sua vez, ativa a formação da proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR – *steroidogenic acute regulatory protein*)(COOKE,1999), indispensável para a transferência do colesterol para o interior da membrana mitocondrial (PAYNE; YOUNGBLOOD; 1995; DOMENICE *et*

al., 2002). A cascata da fosfolipase C também é ativada na presença de LH, porém, não há evidências de que esta via induza a síntese de T (BHASIN, 2008).

O LH aumenta, também, a concentração de cálcio intracelular a partir de reservas celulares, além de aumentar a síntese do ácido araquidônico (AA) a partir da membrana fosfolipídica e aumentar o efluxo de íons cloreto (DONG; HARDY; 2004). Todos esses mecanismos estão envolvidos no processo de biossíntese de testosterona (COOKE *et al.*, 1992) (Figura 8).

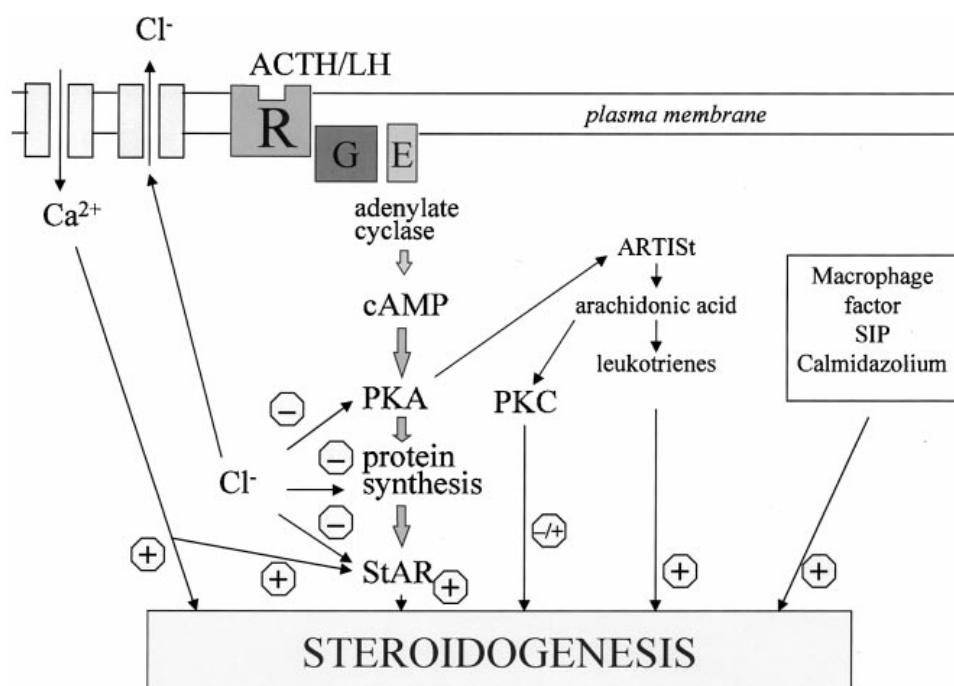


Figura 8 – Mecanismos de controle da androgênese (Reproduzido com permissão de Elsevier.Cooke BA. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology 151 (1999) 25–35; Copyright Elsevier).

O precursor da biossíntese de T é o colesterol, proveniente do plasma, das próprias células de Leydig que o sintetizam e dos ésteres de colesterol armazenados nas células de Leydig (BHASIN, 2008). A biossíntese de T requer a participação de uma série de reações enzimáticas citocromo-P450 e desidrogenase dependentes (PAYNE; YOUNGBLOOD; 1995).

O colesterol é convertido em pregnenolona após sua entrada na membrana mitocondrial, pela enzima citocromo-P450 de clivagem da cadeia lateral do

colesterol (P450scc), em um processo que envolve três reações: 20 α -hidroxilação, 22-hidroxilação e quebra da cadeia lateral do colesterol, todas mediadas pelo P450scc (PAYNE; YOUNGBLOOD; 1995; DOMENICE *et al.*, 2002; DONG; HARDY; 2004; WINTERS; DALVIN; 2004). A pregnenolona sofre desidrogenação na posição 3 β , pela enzima 3 β -hidroxiesteróides desidrogenase (3 β -HSD), formando progesterona (PAYNE; YOUNGBLOOD; 1995; DOMENICE *et al.*, 2002). A pregnenolona e a progesterona são hidroxiladas na posição 17- α , formando 17-hidroxipregnenolona e a 17-hidroxiprogesteron, respectivamente (DOMENICE *et al.*, 2002). Esta reação é catalisada pela 17- α hidroxilase/G17-20 liase (P450c17) (DOMENICE *et al.*, 2002). Além disso, esta enzima cliva a ponte de carbono 17, 20, convertendo a 17-hidroxipregnenolona em dehidroepiandrosterona e a 17-hidroxiprogesteron em androstenediona (DOMENICE *et al.*, 2002). Por fim, a 17-ceto-redutase, enzima encontrada no retículo endoplasmático, reduz a dehidroepiandrosterona em androstenediol e a androstenediona em testosterona (PAYNE; YOUNGBLOOD; 1995; DOMENICE *et al.*, 2002).

1.3.1.2 Distribuição e metabolismo

Depois de sintetizada, a T atinge os capilares sanguíneos por difusão passiva e alcança a circulação sistêmica, onde será distribuída pelo organismo através de ligações à proteínas plasmáticas, tais como a albumina e a globulina de ligação dos hormônios sexuais (SHBG), embora ela também se encontre na sua forma livre (DONG; HARDY; 2004; SWERDLOFF; WANG; 2004; BHASIN, 2008; GUYTON; HALL; 2011).

Embora a T possa sofrer metabolização em tecidos periféricos, como próstata e pele, ela é metabolizada principalmente no fígado (BHASIN, 2008). Além disso, a

T é convertida, de forma irreversível, em estradiol (E2) pela enzima aromatase (P450arom) e em diidrotestosterona (DHT), pela enzima 5 α -redutase (ANDERSON; BAIRD; 2002; DONG; HARDY; 2004; SNYDER, 2012). Esta última conversão é muito importante pois a DHT é um andrógeno mais potente que a T, por ter maior afinidade ao receptor e produzir respostas com maior eficiência (SNYDER, 2012) (Figura 9). A fração da testosterona que não foi convertida é metabolizada a glicuronídeos e sulfatos, que são excretados pelo rim e pela bile hepática (BHASIN, 2008).

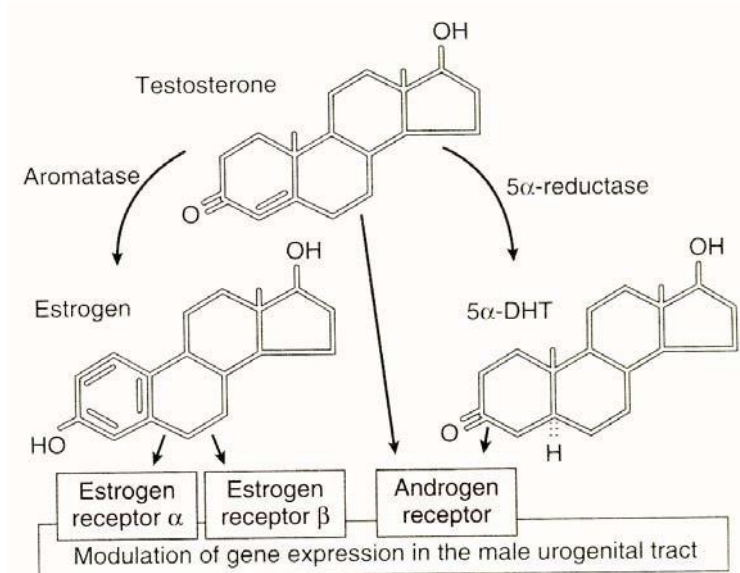


Figura 9 – Conversão da testosterona em metabólitos ativos (Reproduzido com permissão de Elsevier. SWERDLOFF RS; WANG C. In Goldman et al: Cecil – Textbook of Medicine. 22nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2004. p.1473, Copyright Elsevier).

1.3.1.3 Mecanismo de ação e efeitos biológicos

Os efeitos da T e da DHT no organismo ocorre devido ao aumento da síntese de proteínas nas células-alvo, por estimular a transcrição DNA-RNA (BHASIN, 2008; GUYTON; HALL; 2011).

Por tratar-se de um hormônio lipossolúvel, a T atravessa a membrana plasmática por difusão passiva e interage com receptores nucleares (BHASIN, 2008; GUYTON; HALL; 2011). Células que expressam a enzima 5 α -redutase convertem a

T em DHT (BHASIN, 2008). Tanto a T quanto a DHT ligam-se a receptores de andrógenos citoplasmáticos e o complexo hormônio-receptor ativado migra para o núcleo, onde o mesmo se liga ao *elemento de resposta hormonal*, que é uma sequência específica de DNA regulador, induzindo o processo de transcrição DNA-RNA, para dar origem à proteínas que passarão a controlar a célula (BHASIN, 2008; GUYTON; HALL; 2011).

Os receptores de andrógenos estão presentes em diversos órgãos e tecidos, tais como nos órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino, no cérebro, na musculatura esquelética, no coração, na musculatura lisa e em células, como as de Leydig e de Sertoli, ambas presentes nos testículos (BHASIN, 2008).

A T e a DHT possuem diversos efeitos no organismo. Os andrógenos estimulam o desenvolvimento da genitália externa masculina, durante a vida intrauterina, o crescimento de pelos, o aumento da massa e a força muscular, o crescimento das epífises ósseas, o aumento da eritropoiese, o aumento da libido; durante a puberdade e, durante a vida adulta e senescência, estes hormônios promovem a calvície, além de estarem associados ao desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna. Nesta fase da vida, os níveis de andrógenos circulantes começam a decrescer, reduzindo, então, a massa muscular, além de alterar a função sexual e diminuir a densidade mineral óssea (GUYTON; HALL; 2011; SNYDER, 2012).

1.3.1.3.1 Regulação hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas

A regulação hormonal das funções reprodutivas masculinas é feita pelos peptídeos hipotalâmicos, pelas gonadotrofinas da adeno-hipófise e pelos esteróides sexuais produzidos nas gônadas, um eixo conhecido como eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (TUREK; 2012).

Para tal, os neurônios hipotalâmicos liberam um decapeptídeo denominado hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). O GnRH é liberado, de maneira pulsátil, na eminência mediana do hipotálamo e é transportado, através do sistema porta hipotalâmico-hipofisário, para a adeno-hipófise, onde estimulará a mesma a liberar LH e o hormônio folículo-estimulante (FSH) (GNESSI *et al.*, 1997; SWERDLOFF; WANG; 2004; WINTERS; DALKIN; 2004; BHASIN, 2008; GUYTON; HALL; 2011; TUREK, 2012). Esta secreção pulsátil do GnRH é essencial para manter a responsividade gonadotrófica e evitar a dessensibilização e infra-regulação dos receptores de GnRH presentes na adeno-hipófise (ANDERSON; BAIRD; 2002).

O GnRH estimula a liberação de LH e FSH pela adeno-hipófise ao ativar receptores acoplados à proteína G presentes na membrana das células gonadotróficas. Após o acoplamento do GnRH nestes receptores, os mesmos mudam sua conformação e ativam a fosfolipase C, que cliva o PIP_2 em IP_3 e DAG. A transdução de sinal desencadeada pelo IP_3 eleva a concentração de cálcio intracelular e permite a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes, assim, permitindo a entrada de mais cálcio na célula, fazendo com que o LH e FSH sejam liberados (GNESSI *et al.*, 1997; WINTERS; DALKIN; 2004).

Impulsos neuronais oriundos de centros cognitivos e sensoriais do encéfalo e diversas substâncias como glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA),

neuropeptídeo Y, opióides, dopamina, noradrenalina, AMPc, NO, prolactina e hormônios sexuais regulam a secreção de GnRH(WINTERS; DALKIN; 2004).

O LH e o FSH são glicopeptídeos formados por duas subunidades: a subunidade α , comum aos dois hormônios, e a subunidade β , que confere especificidade a ação hormonal (WINTERS; DALKIN; 2004; BHASIN, 2008; PARKER, SCHIMMER; 2012).

Tanto o LH quanto o FSH são liberados na corrente sanguínea, sendo transportados até os testículos, onde estimularão as células de Leydig e Sertoli, respectivamente (GUYTON; HALL; 2011; TUREK, 2012). Na membrana plasmática destas células, encontram-se receptores acoplados à proteína G estimulatória, que estimulam a adenilato ciclase, que, por sua vez, catalisa a conversão de ATP em AMPc (PARKER, SCHIMMER; 2012). O LH estimula as células de Leydig a produzir testosterona, enquanto o FSH estimula as células de Sertoli a produzir nutrientes e proteínas para a maturação dos espermatozoides (WINTERS; DALKIN; 2004; BHASIN, 2008; GUYTON; HALL; 2011; TUREK, 2012). Além da produção de nutrientes, as células de Sertoli aumentam a síntese de inibina B, quando são estimuladas pelo FSH. A inibina B atua na adeno-hipófise a fim de diminuir a liberação específica de FSH, por um sistema de retroalimentação negativa (ANDERSON; BAIRD; 2002).

Além da inibina B, o aumento da concentração plasmática de T modula a secreção de GnRH no hipotálamo bem como controla a liberação de LH e FSH pela adeno-hipófise (ANDERSON; BAIRD; 2002). Além disso, o estradiol, seja por aromatização da testosterona ou por ação direta, também participa do processo de retroalimentação negativa, ao controlar a liberação das gonadotrofinas

(ANDERSON; BAIRD; 2002; WINTERS; DALKIN; 2004; BHASIN, 2008; TUREK, 2012) (Figura 10).

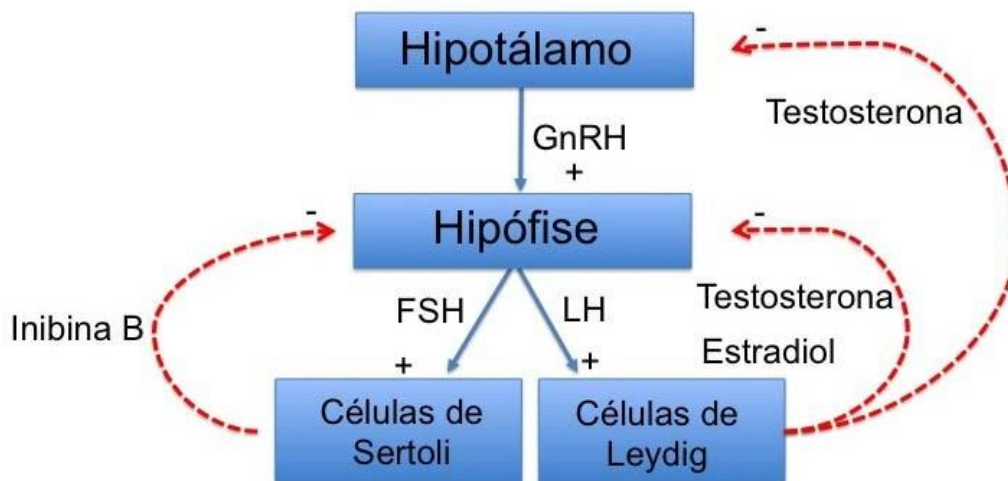


Figura 10 - Controle hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. GnRH = Hormônio de Liberação das Gonadotrofinas; LH = Hormônio Luteinizante; FSH = Hormônio Folículo-Estimulante. Setas tracejadas (vermelhas) = inibição; setas azuis = estimulação. (Criação da autora).

1.3.1.3.2 Efeitos da testosterona sobre a função e disfunção erétil

Como mencionado anteriormente, a função erétil é resultado de um complexo conjunto coordenado de eventos que envolve a participação tanto de fatores psicológicos, quanto hormonais e neurovasculares (LUE, 2000; BILLUPS, 2005). Esta complexa relação necessita também da integridade estrutural tanto dos tecidos nervosos quanto dos tecidos musculares dos corpos cavernosos. Assim, faz-se necessário um estado hormonal - especialmente dos níveis séricos de T - adequado para que estes fenômenos se estabeleçam de forma ordenada e sequencial (YASSIM; SAAD; 2006). Isto se comprova, clinicamente, com um dos sintomas clínicos e físicos mais frequentes do hipogonadismo: a DE e a disfunção sexual (LUNENFELD, 2002; VERMEULEN, 2002; CORONA *et al.*, 2010; GOOREN, 2010).

Podemos definir o hipogonadismo como sendo uma síndrome clínica e bioquímica associada com o envelhecimento e caracterizada por sinais e sintomas

de deficiência androgênica (WANG *et al.*, 2009). Dados obtidos pelo *Massachusetts Male Aging Study* (MMAS) revelam que os níveis séricos de testosterona total e de testosterona biodisponível diminuem aproximadamente 1,6% e 2 - 3% ao ano, respectivamente (FELDMAN *et al.*, 2002). Paralelamente a isto, observamos um significativo aumento na frequência de DE em indivíduos mais idosos (FELDMAN *et al.*, 1994).

Embora alguns autores questionem o uso da reposição hormonal para o tratamento da DE em pacientes hipogonádicos (MULHALL *et al.*, 2004), evidências clínicas demonstram que a reposição hormonal com testosterona recupera, de forma satisfatória, a função erétil em aproximadamente 56% dos homens com hipogonadismo (JAIN *et al.*, 2000; GREENSTEIN *et al.*, 2005). Aliado a este fato, há um crescente número de artigos na literatura que apontam para a importância da T na fisiologia da ereção (MILLS *et al.*, 1996; SHABSIGH, 1997; JAIN *et al.*, 2000. TRAISH *et al.*, 2007; GURBUZ *et al.*, 2008; TRAISH, 2009).

Diversos estudos experimentais foram conduzidos com o intuito de avaliar a influência da T e da falta deste andrógeno sobre a estrutura morfológica dos tecidos eréteis, bem como sobre a expressão e atividade da NOS. Estes estudos claramente evidenciam o papel relevante dos andrógenos na fisiologia e fisiopatologia da DE, bem como no controle da apoptose tecidual ao nível dos corpos cavernosos (KIESS; GALLAHER; 1998; TRAISH *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009; VASCONSUELO *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2012), porém a influência da T sobre a via do NO continua em debate.

Traish e colaboradores (2005) constataram que a deposição de adipócitos na região subtúnica da túnica albugínea, em coelhos castrados, poderia, de forma substancial, interferir com a função veno-oclusiva necessária para o mecanismo

eretivo satisfatório (TRAISH *et al.*, 2005). Além disso, Shen e colaboradores (2003) demonstraram que a redução de fibras elásticas na túnica albugínea e a de fibras musculares lisas nos corpos cavernosos estavam associadas com a deficiência de T (SHEN *et al.*, 2003). Traish e colaboradores (1999), por sua vez, demonstraram alterações similares e potencialmente reversíveis com a reposição de T. Recentemente, Miranda e colaboradores (2012) demonstraram que a reposição hormonal tardia com T foi capaz de recuperar a musculatura lisa de animais orquiectomizados bilateralmente, sugerindo, portanto, que a T reverte os danos morfológicos causados pela ausência deste hormônio. Todos estes dados, em conjunto, evidenciam o impacto da T sobre a função e disfunção erétil, bem como sobre a musculatura lisa. Visto que este tecido participa ativamente da tumescência e detumescência peniana e está intimamente envolvido na função veno-oclusiva, qualquer dano neste tecido, seja ele estrutural ou funcional, culminará em DE (ANDERSSON; WAGNER; 1995; NEHRA *et al.*, 1996; NEHRA *et al.*, 1998; LUE, 2000; TRAISH *et al.*, 2003; TRAISH, 2009, LUE, 2012).

Níveis adequados de T não são apenas necessários para a estrutura do corpo cavernoso, mas também para o controle da apoptose tecidual. Há claras evidências na literatura demonstrando o papel dos andrógenos no controle da morte celular programada (KLEIN *et al.*, 1997; KIESS; GALLAHER; 1998; USER *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2004; MORIMOTO *et al.*, 2005; ESTRADA *et al.*, 2006; MOSTAFA *et al.*, 2010; VASCONSUELO *et al.*, 2011).

A apoptose, ou morte celular programada, é um evento celular coordenado que ocorre, normalmente, durante o processo de desenvolvimento e de envelhecimento, como parte do mecanismo de homeostasia (ELMORE, 2007;

VASCONSUELO *et al.*, 2011). Contudo, a apoptose também pode ocorrer devido a uma agressão celular, como parte de um mecanismo de defesa (ELMORE, 2007).

Diversos estímulos, tanto fisiológicos quanto patológicos, podem desencadear apoptose, seja estimulando a via extrínseca, ou a intrínseca (ELMORE, 2007). Um destes estímulos é a T, que, dependendo do tipo celular e/ou do tecido, da concentração de T, da fase do ciclo em que a célula se encontra e do próprio ambiente no qual a célula está inserida, pode ter efeitos de proteção contra a apoptose, ou, até mesmo, de indução da morte celular programada (KIESS; GALLAHER; 1998; VASCONSUELO *et al.*, 2011). Observamos, claramente, este efeito antagonista em diversos tecidos, como tecidos andrógenos-dependentes, tais como a próstata e em células nervosas.

Neste sentido, estudos têm demonstrado que os andrógenos são essenciais para a manutenção da homeostase entre proliferação celular e apoptose na próstata (PANG *et al.*, 2002; TAM *et al.*, 2003; RUDOLFSSON; BERGH; 2008; ZHU *et al.*, 2008). Conforme estudos, a próstata de animais castrados sofre extensa apoptose, enquanto a próstata de animais castrados que receberam reposição hormonal com T volta a seu tamanho original, com intensa proliferação de novas células epiteliais (ENGLISH *et al.*, 1985; EVANS; CHANDLER; 1987). Acredita-se que os efeitos protetores da T contra a apoptose celular ocorram devido a estimulação de receptores mitocondriais, bem como pela ativação de uma cascata intracelular que atuará na referida organela (VASCONSUELO *et al.*, 2011).

Em contrapartida, Estrada e colaboradores (2006) demonstraram que, em neurônios, níveis elevados de T podem induzir morte neuronal por apoptose, devido ao aumento excessivo das concentrações de Ca^{2+} intracelular, pois o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ativa a clivagem de DNA por nucleases, durante a

apoptose (KIESS; GALLAHER; 1998; ESTRADA *et al.*, 2006). Além disso, os autores observaram que a T atuava de modo dose-dependente no aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelular, ou seja, em doses mais baixas (100nM), a T produzia níveis oscilados de Ca^{2+} , o qual contribuía para os processos fisiológicos de ação dos andrógenos sob os neurônios (ESTRADA *et al.*, 2006). Contudo, com doses maiores de T (1-10 μM), perdia-se o padrão de oscilação do Ca^{2+} , e ocorria o aumento prolongado das concentrações deste íon no meio intracelular, o suficiente para estimular a apoptose (ESTRADA *et al.*, 2006). Provavelmente esta liberação desenfreada de Ca^{2+} intracelular ocorra por uma falha na abertura dos receptores IP_3 -específicos no retículo endoplasmático, permitindo que o Ca^{2+} saia do retículo de maneira desenfreada (ESTRADA *et al.*, 2006).

De maneira semelhante, Bowles e colaboradores (2007) demonstraram que altos níveis de T ativavam a PKC, a qual, por sua vez, inibia a proliferação das células musculares lisas das coronárias e estimulava a apoptose das mesmas (BOWLES *et al.*, 2007). Portanto, torna-se evidente que a regulação hormonal da apoptose consiste em efeitos anti-apoptóticos quanto pró-apoptóticos (KIESS; GALLAHER; 1998; VASCONSUELO *et al.*, 2011).

Além do controle da apoptose, os andrógenos também estão envolvidos no controle da proliferação celular, principalmente em tecidos andrógeno-dependentes (PANG *et al.*, 2002; TAM *et al.*, 2003; RUDOLFSSON; BERGH; 2008; ZHU *et al.*, 2008). Traish e colaboradores (2005) demonstraram que a linhagem de células mesenquimais pluripotentes seguem um curso miogênico em situações nas quais os níveis séricos de testosterona estão normais e um curso adipogênico quando há níveis subnormais de andrógenos, pois os andrógenos induzem a síntese de proteínas miogênicas, tais como a MyoD e a cadeia pesada de miosina do tipo II

(MHC) de maneira dose-dependente (ANDERSSON; WAGNER; 1995; BHASIN *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2005).

Em relação ao controle hormonal da expressão de NOS e, consequentemente, da produção de NO, ainda encontramos dados conflitantes na literatura. Grande parte dos pesquisadores, no entanto, aceitam a teoria de que tanto a expressão de NOS quanto a formação de NO são regulados por níveis adequados de T (BABA 2000; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Devido à alta prevalência de hipogonadismo secundário entre os homens, há uma crescente preocupação sobre os danos causados por esta condição na função reprodutiva e sexual masculina.

A análise da micro-estrutura do corpo cavernoso é de grande utilidade para entender como ocorrem e quais são as diferenças a nível celular entre o processo erétil em indivíduos normogonádicos, hipogonádicos e hipogonádicos que foram submetidos à terapia de reposição hormonal com testosterona. Com base nesses conhecimentos, poderemos compreender melhor o papel dos andrógenos no fenômeno eretivo, além de estabelecer medidas mais eficazes para o tratamento de pacientes com esse tipo de condição clínica.

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 Objetivo Geral

Observar os efeitos histomorfométricos e apoptose envolvidos no corpo cavernoso de ratos submetidos à ablação androgênica, com ou sem reposição hormonal com testosterona.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o diâmetro peniano de ratos submetidos à ablação androgênica, com ou sem reposição hormonal com testosterona.

Avaliar a quantidade de músculo liso, de fibras elásticas, de fibras colágenas, de espaço sinusoidal e a taxa de apoptose celular no corpo cavernoso de ratos submetidos à ablação androgênica, com ou sem reposição hormonal com testosterona.

4. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Artigo a ser submetido para publicação no *The Journal of Urology*

Fator de Impacto JCR/2012:**3.696.**

Running head: Testosterone maintains smooth muscle content**Testosterone replacement maintains smooth muscle content in the
corpus cavernosum of orchiectomized rats****Authors**

Graziele Halmenschlager, M.Sc.(1)

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD (2)

Gabriela Almeida Motta, Bel (1)

Jorge Luis Medeiros Júnior, M.Sc.(3)

Rosalva Meurer, M.Sc. (1)

Cláudia Ramos Rhoden, PhD (1)

Affiliation

1 - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) –
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
(ISCOMPA) and Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre (HMOV).

3 – Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

Corresponding Author:

Graziele Halmenschlager

Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS,

Zip-code: 90050-170, Brazil.

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

E-mail: grazihal@gmail.com

Conflict of Interest: None

Acknowledgement:

M.Sc. Halmenschlager is supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES*

We thank UFCSPA, CNPq and FAPERGS for financial support.

Key-works: testosterone replacement, histomorphometry; NO; androgen deprivation; hypogonadism.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the effects of testosterone on the maintenance of CC structure, on apoptosis and on nitric oxide (NO) levels.

Materials and Methods: Animals were divided into three groups: *Sham operation* group (n= 5-8) underwent sham operation; Orchiec + oily vehicle group (n= 7-8) underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of oily vehicle by intramuscular injection (i.m.) 30 days after orchiectomy and Orchiec + T group (n= 5-7) underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of testosterone undecanoate 100mg/kg i.m. 30 days after the surgery. Azan's trichrome staining was used to evaluate smooth muscle in penile cavernosal tissue, Weigert's Fuchsin-Resorcin staining was used to evaluate elastic fibers and picrosirius red staining was used to evaluate collagen. Apoptosis was evaluated using TUNEL technique. NO was determined using the Griess reagent. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results: Testosterone levels were decreased in Orchiec + oily vehicle when compare to *sham operation* and Orchiec + T groups ($P < 0.001$). Testosterone deprivation reduced trabecular smooth muscle content and penile diameter and testosterone replacement maintained Azan's trichrome staining and penile diameter ($P = 0.005$; $P = 0.001$, respectively). No difference was observed in the content of sinusoidal space ($P = 0.207$), elastic fibers ($P = 0.849$), collagen ($P = 0.216$), apoptosis ($P = 0.095$) and in NO levels among groups ($P = 0.526$).

Conclusion: Testosterone levels maintain CC smooth muscle content and do not influence elastic fibers, collagen content as well as apoptotic index and NO

levels. Further studies should be performed in order to investigate the mechanisms by which androgen mediates its effects on CC structure.

INTRODUCTION

It is well established that erectile function is a complex coordinated cascade of events that requires the interplay among physiological, neural, vascular and hormonal factors as well as the correct balance of corpus cavernosum (CC) histological structure.¹ Probably, one of the most important mediator that connect all of those factors is testosterone (T), an essential hormone involved in normal sexual male response.^{1,2} Although there are clinical evidences demonstrating that low levels of T are associated to erectile dysfunction (ED),³ this subject is still controversial, since some authors have not observed any association between T levels and ED.⁴ In fact, the exact role of androgens in erectile function and dysfunction remains unclear.^{1, 5, 6}

Traish *et al* (1999; 2003) observed that androgen deprivation by surgical castration damages the structure of CC, leading to veno-occlusive dysfunction, which is an important cause of organic ED.^{1, 5, 6} Recently, Miranda *et al* (2012) evidenced that T deprivation decreases smooth muscle and sinusoidal space content, an effect reversed by testosterone replacement.⁷ The decrease of smooth muscle content in response to androgen deprivation is believed to be due to increased cellular apoptosis.¹ In fact, there are several data demonstrating increased apoptotic cells following androgen deprivation.^{1,8} Besides that, T replacement prevents CC structures apoptosis, suggesting that androgen may have a role in the apoptotic cascade.⁸

However, erectile function is not only regulated by penile tissue structures, but also by neurotransmitters, such as NO.² Conversely, the effects of T on NO production are still not clear. Some authors have observed that T regulates the expression and activity of nitric oxide synthase (NOS),^{1,2,9} while

others have suggested that NO pathway may not be influenced by androgens.^{5,6}

Therefore, the aim of the present study is to evaluate the effects of T on the maintenance of CC histological structures (smooth muscle, collagen, elastic fibers and sinusoidal space), on apoptosis and on NO levels, in order to better elucidate the interplay among androgens, CC structures and neurotransmitters.

METHODS

Animals and Study design

The experimental protocol was approved by our local Ethical Committee for Research and all efforts were made to minimize discomfort, distress and animals' suffering. Besides that, all experimental procedures were carried out according to ethical care guidelines.

Ninety-day old male Wistar rats (± 250 g), obtained from the animal facility of our University, were used in the present study. The animals were maintained under standard conditions of temperature ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12 h light/dark cycle (lights off at 5 p.m). The animals were fed a standard laboratory rat chow and had water available *ad libitum*.

Animals were divided into three groups: *Sham operation* group (n= 5-8) underwent *sham operation*; Orchiec + oily vehicle group (n= 7-8): underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of oily vehicle by intramuscular injection (i.m.) 30 days after orchiectomy and Orchiec + T group (n= 5-7): underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of testosterone undecanoate (Nebido®, Bayer Schering Pharma, Berlin, Germany) 100mg/kg i.m.¹⁰ 30 days after the surgical procedure.

Both oily vehicle and testosterone undecanoate were injected into the animals' muscle biceps femoris in the right hind leg.

All animals were euthanized 60 days after the beginning of the experiment with an anesthetic overdose of ketamine and xylazine.

Animals' body weight was monitored every 15 days with a digital electronic scale.

Surgical procedure

Under sterile condition and ketamine and xylazine (10mg/Kg; 80mg/Kg i.p, respectively) anesthesia, animals from Orchiec + oily vehicle and Orhiec + T groups were submitted to bilateral orchiectomy. The surgical procedure was performed with a 2-cm scrotal midline incision and both testes were removed. Sham operation group underwent the same surgical procedure and manipulation; however, the testes were not removed.

Ibuprofen (Buprovil®, Multilab, São Jerônimo, RS, Brasil) 20mg/kg, 8-8h, was given by gavage to animals as an analgesic agent during two consecutive days.

Total testosterone determination

At the end of the experiment, animals were euthanized with an overdose of ketamine and xylazine, as mentioned before. Immediately after this procedure, while the animals were still alive, a cardiac puncture was performed in order to collect blood samples for total testosterone determination.

Serum total testosterone levels were determined by chemiluminescence (Immulite®, DPC, Los Angeles, CA, USA). Results are expressed in ng/dL.

Histological procedures

After blood drawn, 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. Part of the penis was immediately frozen at -80°C for posterior NO metabolites analysis. The remaining was immediately fixed in 10%

buffered formalin and penile mid-shaft segments were embedded in paraplast according to standard histological techniques.

For histomorphometric analysis, a total of five 100 μ m-equidistant transversal penile tissue sections (5 μ m-thick) were taken from each specimen. From each section, five random fields were analyzed, totalizing 25 evaluated fields (test area) per animal, per stain used.¹¹ 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 Fuchsin-Resorcin staining, with previous oxone oxidation, in order to detect oxitalan, elaunin and elastic fibers.¹¹

Due to collagen fibers' birefringence, all sections were also stained with Picrosirius red and were observed under light polarization, in order to quantify collagen fibers.¹²

Histomorphometric measurements

All histological analysis was performed by the same examiner (GH), who was blind to the animal's treatment. Image acquisition as well as 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.

Penile diameter measurements were performed in triplicate in five transversal penile tissue sections (x20 final magnification), per rat, using ImageJ 1.45s (NIH, USA). For statistical analysis, mean values for each rat (the mean of the five sections and triplicate measurements) were calculated and used for comparisons of the 3 groups.

Smooth muscle, sinusoidal space (X400 final magnification) as well as elastic fibers content (X1000 final magnification) were quantified using a manual point-counting method.¹³ 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 percentage of smooth muscle, sinusoidal space as well as elastic fibers content were calculated by dividing the number of points counted per number of total points x 100.

Due to collagen characteristic birefringence, collagen content was determined using semi-automated color segmentation method,¹³ performed in Image-Pro® Plus software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). As previously described, this method is based on converting an image into a binary image, by applying a mask with consequent conversion of the selected component into a black-and-white image.¹³ By analyzing the histogram of the image, it is possible to quantify the selected histological structure.¹³ In our study, the image background was selected and we applied a mask, where the image background as well as other histological components became white and the area occupied by collagen fibers became black. The software, thus, calculated the area (%) occupied by the black color (collagen).¹³

For statistical analysis, mean values for each CC (the mean of the 25 images analyzed per rat) were calculated and used for comparisons of the 3 groups.

In situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick-end Labeling (TUNEL) staining procedure:

In order to detect *in situ* apoptotic cells, Click-iT® TUNEL Alexa Fluor 488 Imaging Assay (Invitrogen, Baltimore, Maryland, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, after formalin-fixed, paraplast-embedded 5 µm-thick sections' deparaffinization and hydration, the slides were pretreated with 2% glycine and ammonium chloride 50mM for blocking aldehyde group and were incubated with TdT and EdUTP reaction cocktail for 60 min at 37°C in a humidified chamber. Afterwards, penile sections were incubated with Click-iT® reaction cocktail for 30 min at room temperature for fluorescent detection of EdUTP. Penile tissue nuclei were counterstained with Hoechst 33342 for 15 min at room temperature. The slides were, then, mounted with glass coverslips. Positive control sections were prepared with DNase incubation for 30 min at room temperature. TdT reaction cocktail was omitted in negative control sections.

For TUNEL staining procedure, a total of two 100µm-equidistant transversal penile tissue sections were analyzed. From each section, five random fields were evaluated, totalizing 10 evaluated fields (test area) per animal.

Apoptotic index analysis:

TUNEL-labeled nuclei (apoptotic cells) were visualized using a fluorescent microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) coupled with a digital camera (DP72, Olympus, Tokyo, Japan). After image acquisition (X600 final magnification), the number of TUNEL-labeled nuclei and the number of Hoechst-labeled nuclei were counted in 10 random fields per animal. The mean values were obtained for each rat and these means were used to calculate the apoptotic index, which was obtained by dividing the number of TUNEL-labeled nuclei by Hoechst-labeled nuclei (total number of nuclei) x 100.¹⁴ Results are expressed in percentage (%).

Determination of NO metabolites (NOx)

Penile tissue was homogenized in 1,15% w/v KCl and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 20 mmol/L using an ultra-turrax blender. The homogenized was then centrifuged at 1000g for 10 min at -4°C to remove cell debris. The supernatants were used to determine NO metabolites (nitrites and nitrates)

Nitrites (NO₂) and nitrates (NO₃), an indirect method to measure NO, were determined in according to Granger *et al* (1999),¹⁵ using the Griess reagent. All measurements were performed in duplicate. A standard curve was established with a set of serial dilutions (10⁻⁸–10⁻³mol/l) of sodium nitrite. NOx metabolites were quantified at 540 nm. Results were expressed as nmol/mg protein of nitrates plus nitrites (Nitrates plus nitrites = Nitric oxide).¹⁵

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD), unless otherwise stated. We used Repeated-Measure Analysis of Variance (RM-ANOVA) to compare body weight evolution among groups. One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test was used to compare means of T, body weight, penile diameter, smooth muscle, sinusoidal space, elastic fibers and collagen content among groups. Pearson correlations were used to verify the correlation between T levels and smooth muscle content. Apoptotic index and NOx levels were compared using Kruskal-Wallis test, due to the non-normally distributed data.

All statistical analyses were performed using SPSS statistical software package version 12.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical significance was set at $P \leq 0.05$. The graphic was done using SigmaPlot software version 11.0 for Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

RESULTS

At the beginning of the experiment, baseline animal's body weight was accessed. The mean body weight ($\pm$ SD) was 245.50 g ($\pm$ 48.80 g) in *sham operation* group (n=8), 242.12 g ($\pm$ 38.50 g) in Orchiec + oily vehicle group (n=8) and 247.00 g ($\pm$ 47.42 g) in Orchiec +T group (n=8) (P=0.977).

As expected, T levels were statistically decreased in Orchiec + oily vehicle group (7.02 ± 2.52 ng/dL; n=8) when compare to *sham operation* (358.10 ± 178.38 ng/dL; n= 7) and Orchiec +T group (237.68 ± 153.01 ng/dL; n=6) (P<0.001). This result indicates that T replacement was effective. Similarly, there was a statistical significant decrease in penile diameter in Orchiec + oily vehicle group (3.04 ± 0.32 mm; n=8) when compare to *sham operation* (3.40 ± 0.20 mm; n=7) and Orchiec +T group (3.70 ± 0.22 mm; n=6) (P=0.001).

T deprivation reduced mean trabecular smooth muscle content as well as penile diameter and androgen replacement maintained both Azan'strichrome staining and penile diameter (P=0.005; Figure 1A and P=0.001;Table 1, respectively). In addition, there was a positive statistically significant correlation between T levels and mean trabecular smooth muscle ($r=0.613$; P=0.005). However, no statistical significant difference was observed in the mean content of sinusoidal space (P=0.207), elastic fibers (P=0.849) and collagen (P=0.216) (Figures 1 and 2).

As depicted in Table 1, no statistical significant difference was observed in penile apoptotic index (P=0.095, Figure 3) as well as in NO levels among groups (P=0.526).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that T replacement of castrated rats maintained trabecular smooth muscle content as well as penile diameter and did not alter the content of sinusoidal space, elastic fibers and collagen. Furthermore, T deprivation and replacement did not change CC apoptotic index and NO levels, suggesting that androgens do not have a significant influence in NO pathway.

Several studies have highlighted the importance of androgens in erectile function, either in terms of penile tissue function or structure.^{1,2,7} As erectile function is a complex event that requires the synchronism of neural, vascular, hormonal factors as well as the integrity of CC tissue,¹ any imbalance in these components may result in ED.⁵

Trabecular smooth muscle is probably one of the most important structure in the penis. This structure is responsible for penile detumescence and erection¹⁶ and is closely related to veno-occlusive function.¹ Our data indicate that androgen replacement maintained trabecular smooth muscle stained and testosterone deprivation decreased trabecular smooth muscle content. Our results are consistent with some previous studies.^{5-7,17} Traish *et al* (1999) demonstrated that castration significantly reduced intracavernosal pressure (ICP) as well as decreased trabecular smooth muscle content.⁵ Seven days after orchiectomy, testosterone replacement was given and restored both parameters to control levels.⁵ Although Miranda *et al* (2012) have replaced testosterone after 1 month of androgen ablation and the authors have found similar results: decreased absolute values of smooth muscle in the castrated group and that testosterone replacement restored its content.⁷

Albeit some studies have demonstrated that androgens act directly in smooth muscle content,⁵ the exact mechanism by which androgen deprivation reduces smooth muscle content is not known. It has been observed that androgen deprivation induces the onset of apoptotic activity in penile CC.^{1,8,18} Moreover, experimental studies have pointed out that T supplementation can prevent programmed cell death promoted by androgen ablation,⁸ suggesting that androgens may be involved in the control of apoptosis.¹⁹ The increased apoptotic index induced by androgen ablation may explain the decrease in smooth muscle content observed after castration¹ and the decrease in penile size after penile denervation.¹⁴

Although there are strong evidences showing the effects of T withdrawal and replacement on apoptosis regulation,^{1,8,19} our results indicate that apoptosis was not influenced by long-term androgen deprivation and replacement. Our results are in agreement with some studies published so far.^{18,20,21} Nakazawa *et al* (2007) have studied the effects of castration and T administration on rat urinary bladder and found no significant effect of T on TUNEL-labeled nuclei.²⁰ It is important to highlight that the authors have started T replacement after 4 weeks of castration, similar to our replacement protocol. Additionally, as far as we are concerned, this is the first study published in literature that evaluated CC apoptotic index after long-term androgen deprivation and after late androgen replacement.

Even though we have not found any statistical significant difference in the apoptotic index among groups, this does not necessarily reflect an absence of apoptosis in penile CC. Some important studies in the field have indicated that the apoptotic index peaks on the 2nd day after cavernous nerve injury and

returns to baseline levels 14 days after nerve damage.¹⁴ Similarly, Yamamoto *et al.* (2004) have observed that penile apoptotic cells were increased after the 5th day after bilateral orchiectomy and returned to baseline levels after the 14th and 20th days after the surgery.¹⁸ These results indicate that T withdrawal has an early effect on penile tissue and that the penis is dependent upon physiological levels of T.²² The decreased in both smooth muscle content and penile diameter found in castrated group, compared to control and T replacement groups, could be explained by an early apoptosis promoted by the lack of T. This apoptosis has probably returned to control levels, suggesting a timing of hormonal effect on apoptosis.¹⁹

Our results reveal that T replacement of castrated rats maintained trabecular smooth muscle content. This observation might be explained by new DNA synthesis induced by T.²³ Furthermore, it is suggested that androgens modulate the differentiation of mesenchymal multipotent cells into smooth muscle cell, by inducing myogenic proteins, such as MyoD and myosin heavy chain II (MHC) in a dose-dependently response.^{24,25} Additionally, androgen receptor (AR) signaling and its interaction with β -Catenin and T-cell factor-4 (TCF-4) up-regulates a number of Wnt-target genes, such as follistatin (Fst), which, in turns, binds to myostatin (a known Transforming Growth Factor (TGF)- β family member that inhibits muscle differentiation), antagonizing its activity.²⁶ Therefore, this cross talk between AR signaling to the TGF- β pathway plays an important role in the regulation of myogenic differentiation by androgens.²⁶

An important functional consequence of decreased trabecular smooth muscle content is veno-occlusion dysfunction, which is highly required for an adequate penile erection.^{6,27} As a consequence, decreased trabecular smooth

muscle content promoted by androgen ablation may also lead to ED due to poor venous outflow resistance.²⁷

Although there are overwhelming evidences in literature demonstrating the importance of smooth muscle in erectile function, collagen as well as elastic fibers also play a pivotal role in this physiological process.²⁸ These histological structures are responsible for the maintenance of erection and are important to the rapid return to the non-erect state.²⁹ And, despite of their importance in normal erectile physiology, no study published so far has evaluated the effects of testosterone ablation and replacement in elastic fiber content in CC. An evidence of the participation of elastic fibers content in the development of ED is demonstrated by Costa *et al* (2005).²⁹ In that study, the authors have found that the percentage of elastic fibers in patients with severe ED was statistically decreased when compared to control group.²⁹ Nevertheless, the authors have not evaluated the influence of T in elastic fibers content.

To our knowledge, this is the first study that evaluated the effects of androgen ablation and testosterone replacement on elastic fibers content in CC. Shen *et al* (2003)¹⁷ have evaluated the effects of androgen deprivation on elastic fibers in tunica albuginea and found that elastic fibers were replaced by collagenous fibers.¹⁷ However, the authors have not analyzed elastic fibers in CC. Our results indicate that androgens do not act on elastic fibers content. This data corroborate with a previous study published by Inoue *et al* (2012).³⁰ The referenced authors have evaluated the biosynthesis of sex steroids in human skin and found that aromatase is closely associated with estrogen synthesis and with elastic fiber formation.³⁰ Nevertheless, no influence of testosterone was observed in the synthesis of elastic fibers.³⁰

Regarding collagen content, we have not observed any influence of TT on its content. This result contradicts the ones in literature.^{6,17} Different study design, animal models used as well as different histomorphometric methods employed should explain the discrepant results observed.

As previously mentioned, erectile function is a sum of innumerable factors. One of these factors is NO, the most likely neurotransmitter involved in erectile function.⁹ Our study demonstrates that NO levels were influenced neither by androgen deprivation nor testosterone replacement. This result is in agreement with the ones published by Traish and coworkers (1999; 2003).^{5,6} Traish *et al*,⁵ using a rabbit model, concluded that either neural NO synthase expression or total activity was altered by androgen decrease and testosterone replacement.⁵ Similarly, the same group of authors found that medical and surgical castration did not alter NO synthase activity.⁶ However, most studies support the hypothesis that androgens regulate the production and activity of NOS.^{1,2,9} The explanation for such difference requires further investigation.

Some limitations should be recognized in the current study. First, we have used an animal model (rat) to investigate the role of T on CC histology. However, the rat CC markedly differs from those in human,²⁸ so extrapolation to human beings should be done carefully. Second, surgical castration is not an appropriate model of late-onset hypogonadism (LOH). So every attempt to simulate LOH in animal models and the possible response of testosterone replacement in reversing the damage promoted by castration is not completely reliable because it does not reflect the real/clinical LOH in human beings. This raises questions regarding the model of LOH used nowadays and highlights the

need for the creation of a new animal model of LOH, which would reflect more accurately what really happens in clinical practice.

CONCLUSIONS:

In summary, physiological testosterone levels maintain CC smooth muscle content and do not influence elastic fibers and collagen content as well as NO levels. However, further studies should be performed in order to investigate the mechanisms and signaling pathways by which androgen mediates its effects on CC structure.

REFERENCES

- 1 - Traish AM: Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: a review. *J Androl* 2009; **30**: 363.
- 2 - Traish AM, Goldstein I, Kim NN: Testosterone and erectile function: from basic research to a new clinical paradigm for managing men with androgen insufficiency and erectile dysfunction. *EurUrol* 2007; **52**: 54.
- 3 – Gurbuz N, Mammadov E, Usta FM: Hypogonadism and erectile dysfunction: an overview. *Asian J Androl* 2008; **10**: 36.
- 4 – Rhoden EL, Telöken C, Sogari PR *et al*: The relationship of serum testosterone to erectile function in normal aging men. *J Urol* 2002; **167**: 1745.
- 5 - 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.
- 6 - Traish AM, Munarriz R, O'Connel L *et al*: Effects of medical or surgical castration on erectile function in an animal model. *J Androl* 2003; **24**: 381.
- 7 - 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.
- 8 - Zhang XH, Hu LQ, Zheng XM *et al*: Apoptosis in rat erectile tissue induced by castration. *Asian J Androl* 1999; **1**: 181.
- 9 - Baba K, Yajima M, Carrier S *et al*: Delayed testosterone replacement restores nitric oxide synthase-containing nerve fibres and the erectile response in rat penis. *BJU Int* 2000; **85**: 953.
- 10 – Callies F, Kollenkirchen U, von zurMühlen C *et al*: Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *Exp Clin*

Endocrinol Diabetes 2003; **111**: 203.

11 – Figueiredo MA, Ribeiro IC, Chagas MA *et al*: The penis in diabetes: structural analysis of connective tissue and smooth muscle alterations in a rabbit model. BJU Int 2010; **108**: 400.

12 – Montes GS, Junqueira LCU: The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1991; **86**: 1.

13 – Amenábar JM, Martins GB, Cherubini K *et al*: Comparison between semi-automated segmentation and manual point-counting methods for quantitative analysis of histological sections. J Oral Sci 2006; **48**: 139.

14 – User HM, Hairston JH, Zelner DJ *et al*: Penile weight and cell subtype specific changes in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction. J Urol 2003; **169**: 1175.

15 - Granger DL, Anstey NM, Miller WC *et al*: Measuring nitric oxide production in human clinical studies. Methods Enzymol. 1999; **301**: 49.

16–Andersson KE, Wagner G: The physiology of penile erection. Physiol Rev 1995; **75**: 191.

17 – Shen ZJ, Zhou XL, Lu YL *et al*: Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. Asian J Androl 2003; **5**: 33.

18 – Yamamoto H, Sasaki S, Tatsura H *et al*: Penile apoptosis in association with p53 under lack of testosterone. Urol Res 2004; **32**: 9.

19 – Kiess W, Gallaher B: Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Eur J Endocrinol 1998; **138**: 482.

- 20 – Nakazawa R, Tanaka M, Takahashi T *et al*: Effects of castration and testosterone administration on angiotensin II receptor mRNA expression and apoptosis-related proteins in rat urinary bladder. *Endocr J* 2007; **54**: 211.
- 21 – Lorenzetti F, Pintarelli VL, Seraphim DCC *et al*: Low testosterone levels induce apoptosis via active 3-caspase dependent signaling in the bladder wall of male rats. *Aging Male* 2012; **15**: 216.
- 22 - Shabsigh R: The effects of testosterone on the cavernous tissue and erectile function. *World J Urol* 1997; **15**: 21.
- 23 – Shabsigh R, Raymond JF, Olsson CA *et al*: Androgen induction of DNA synthesis in the rat penis. *Urology* 1998; **52**: 723.
- 24 – Singh R, Artaza JN, Taylor WE *et al*: Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 2003; **144**: 5081.
- 25 – Bhasin S, Taylor WE, Singh R *et al*: The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol* 2003; **58**: M1103.
- 26 – Singh R, Bhasin S, Braga M *et al*: Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ β -Catenin and Follistatin/Transforming Growth Factor- β signaling pathways. *Endocrinology* 2009; **150**: 1259.
- 27 – Nehra A, Goldstein I, Pabby A *et al*: Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure. *J Urol* 1996; **156**: 1320.

28 – Pinheiro ACAD, Costa W, Cardoso LEM *et al*: Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. J Urol 2000; **164**: 1802.

29 - Costa WS, Carrerete FB, Horta WG *et al*: Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. BJU Int 2006; **97**: 567.

30 – Inoue T, Miki Y, Abe K *et al*: 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.

Table 1: Penile diameter, apoptosis and biochemical profile of the evaluated groups

Parameters	<i>Sham operation</i>	n	Orchiec + oily vehicle	n	Orchiec + T	n	P
Penile diameter (mm)	3.40 ± 0.20	7	3.04 ± 0.32	8	3.70 ± 0.22	6	0.001*
Apoptotic index (%)	13.70 [11.09 – 20.75]	6	18.46 [12.81 – 29.54]	8	26.32 [20.44 – 56.09]	5	0.095#
NO	0.49 [0.14 – 0.92]	5	0.19 [0.082 – 0.30]	7	0.15 [0.10 – 0.45]	6	0.526#
(nmol/mg protein)							

Data are expressed as mean ± standard deviation or as median [quartiles]

NO = Nitric oxide.

P = 0.001 when compared to *sham operation* and Orchiec + T groups

P valued obtained by Kruskal-Wallis test.

Sham operation group = sham operation; Orchiec + oily vehicle = underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of oily vehicle by intramuscular injection (i.m.) 30 days after orchiectomy and Orchiec + T = underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of testosterone undecanoate 100mg/kg i.m. 30 days after the surgical procedure.

FIGURES

Figure 1

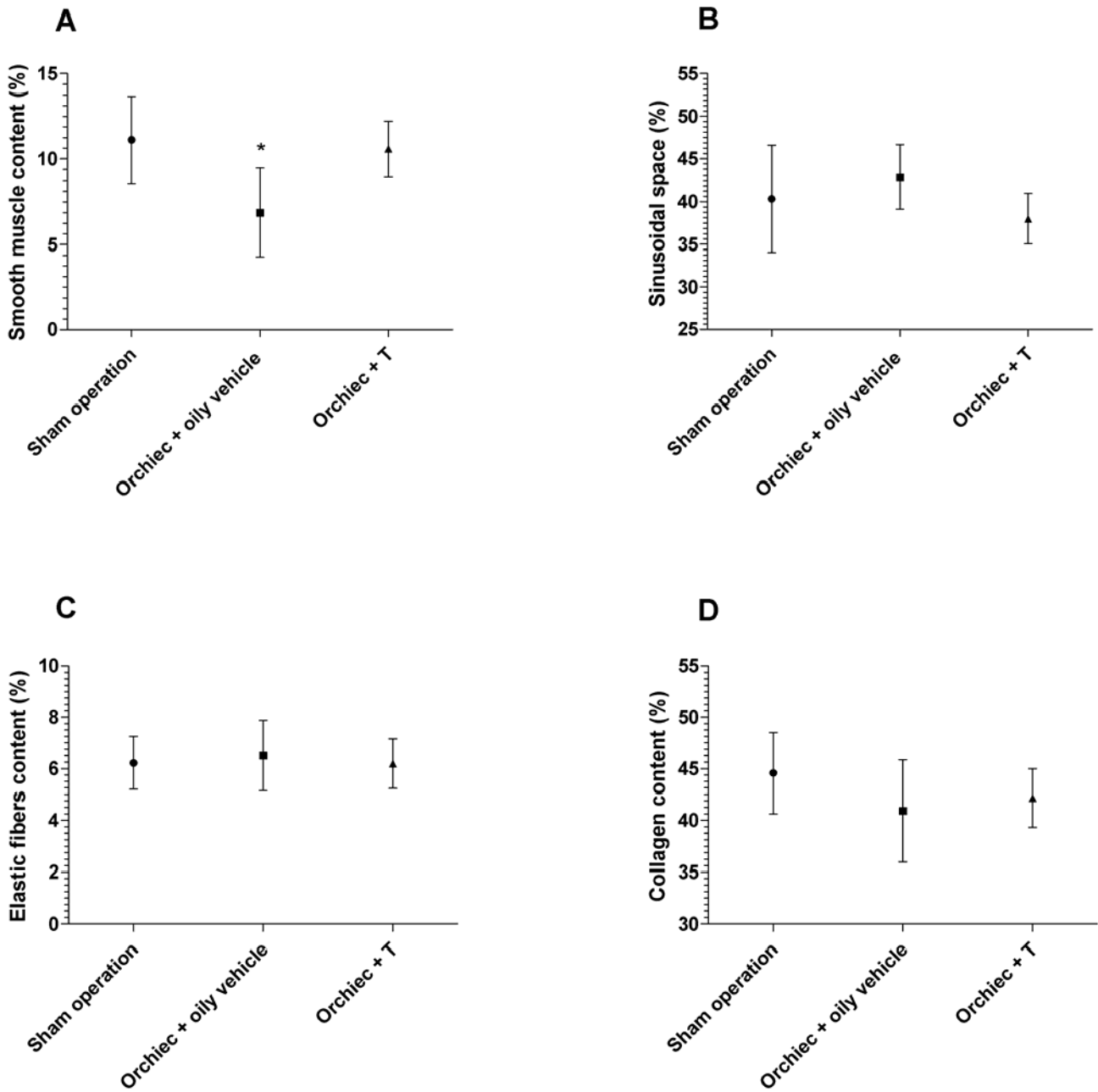
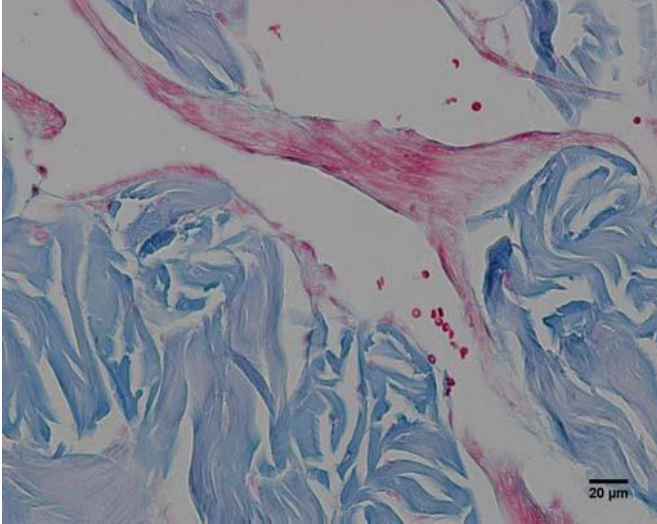
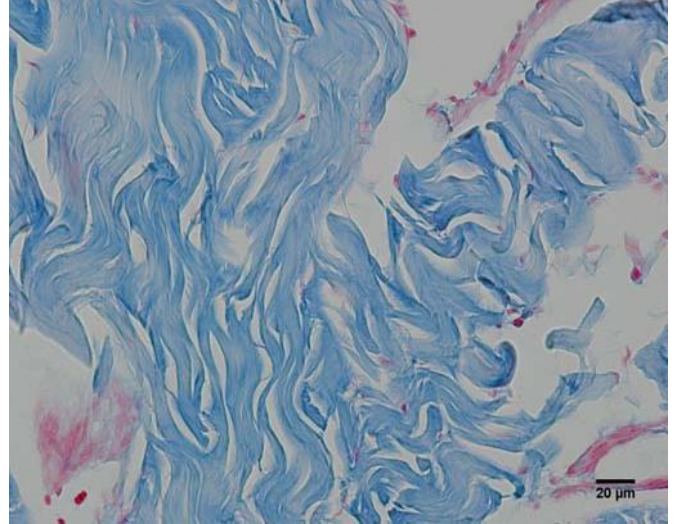
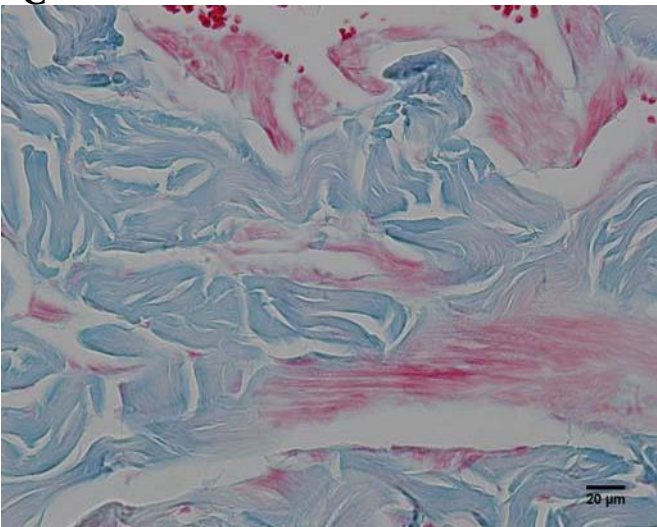
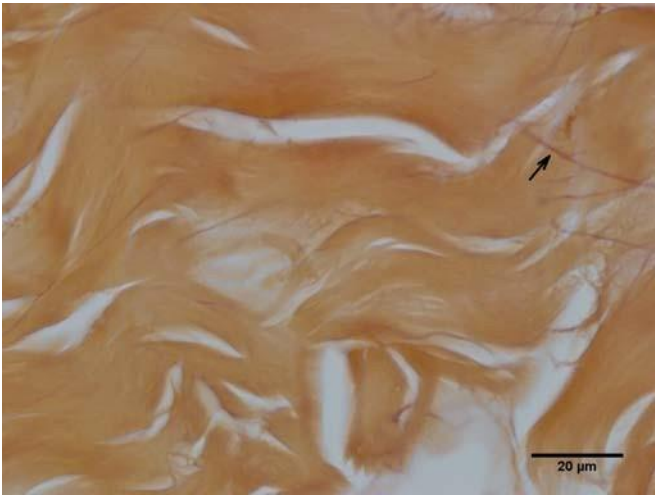
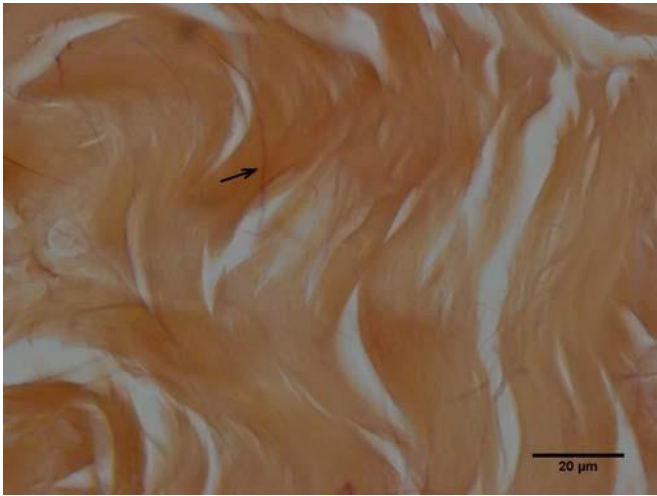


Figure 2**A****B****C**

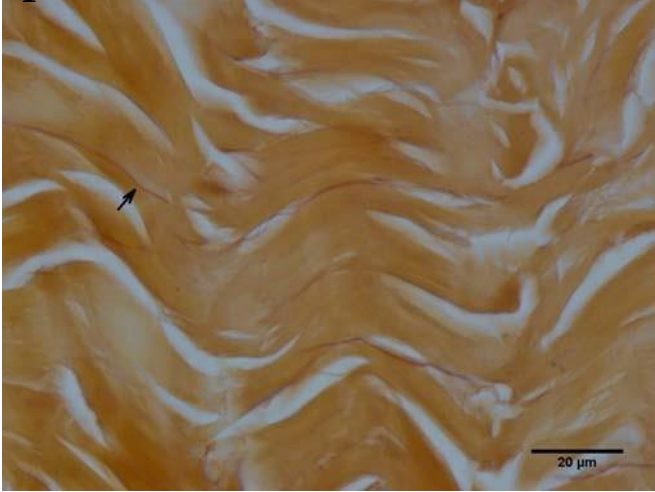
D



E



F



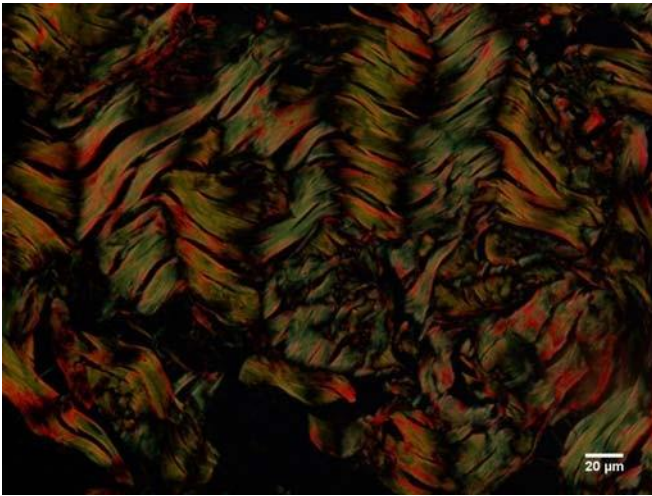
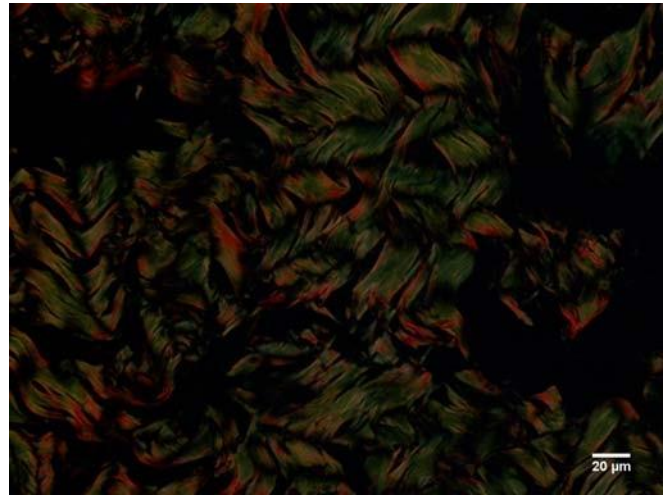
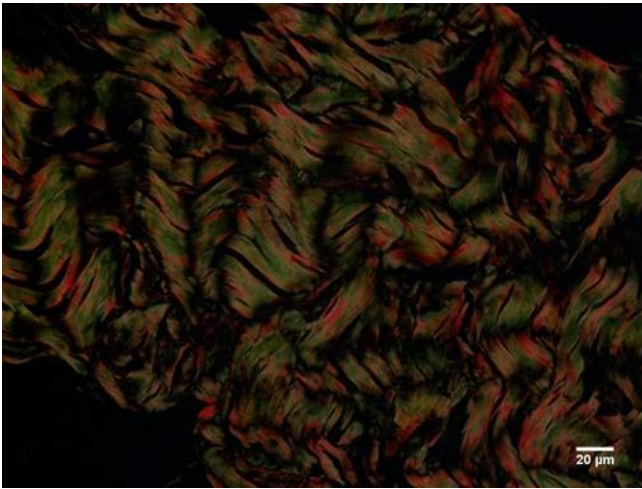
G**H****I**

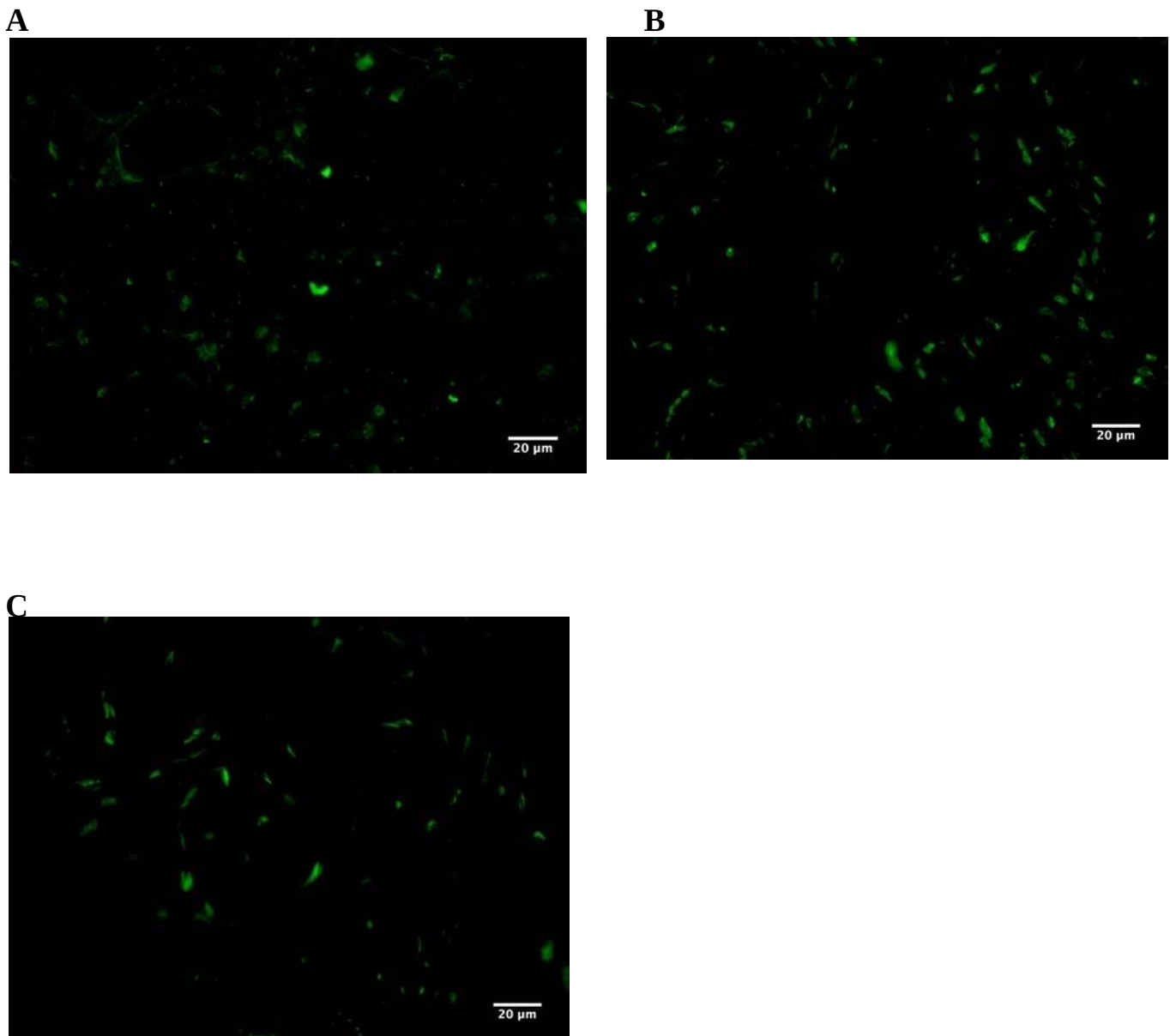
Figure 3

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Percentual mean $\pm$ SD values of: A) Rat corpus cavernosum smooth muscle content; *P = 0.005 when compared to *sham operation* and Orchiec + T groups; B) Rat corpus cavernosum sinusoidal space content; P = 0.207; C) Rat corpus cavernosum elastic fibers content; P = 0.849; D) Rat corpus cavernosum collagen content; P = 0.216. P values obtained by one-way ANOVA. *Sham operation* group = sham operated rats (n= 8)[#]; Orchiec + oily vehicle group = rats underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of oily vehicle by intramuscular injection (i.m.) 30 days after orchiectomy (n = 7) [#] and Orchiec + T group = rats underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of testosterone undecanoate (n = 6) [#]100mg/kg i.m. 30 days after the surgical procedure. [#]Except for collagen variable, where *Sham operation* group: n =8, Orchiec + oily vehicle group: n=8 and Orchiec + T group: n = 7

Figure 2 – Photomicrographs of rat corpus cavernosum demonstrating Azan's trichrome staining (Blue: collagen and red: smooth muscle) at X400 magnification (A, B and C), Weigert's Fucsin-Resorcin staining at X1000 magnification (Arrows indicates elastic fibers) (D, E and F)

and Picrosirius red under polarization at X400 magnification (G, H and I). A, D, G: *Sham operation* group = sham operated rats; B, E, H: Orchiec + oily vehicle group = rats underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of oily vehicle by intramuscular injection (i.m.) 30 days after orchiectomy and C, F, I: Orchiec + T group = rats underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of testosterone undecanoate 100mg/kg i.m. 30 days after the surgical procedure.

Figure 3 – TUNEL-labeled nuclei (apoptotic cells) at X600 magnification. A) *Sham operation* group = sham operated rats; B) Orchiec + oily vehicle group = rats underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of oily vehicle by intramuscular injection (i.m.) 30 days after orchiectomy and C) Orchiec + T group = rats underwent bilateral orchiectomy and received a single dose of testosterone undecanoate 100mg/kg i.m. 30 days after the surgical procedure. $P = 0.095$, obtained by Kruskal-Wallis test.

5. DISCUSSÃO

Esta tese teve como objetivo principal avaliar os efeitos histomorfométricos e a apoptose celular no corpo cavernoso de ratos submetidos à ablação androgênica, com ou sem reposição hormonal com testosterona. Para isso, utilizamos o modelo experimental de orquiectomia bilateral e reposição hormonal com uma dose única de undecanoato de testosterona (100mg/kg), i.m., 30 dias após a orquiectomia, para simular uma reposição hormonal tardia. O modelo de orquiectomia bilateral foi o modelo escolhido neste estudo, pois, atualmente, é a técnica mais utilizada para estudar os efeitos da ablação androgênica sobre diversos órgãos e tecidos, embora ela não seja o modelo ideal. O undecanoato de testosterona foi a preparação escolhida neste estudo, pois possui um perfil farmacocinético favorável: permite níveis plasmáticos de testosterona relativamente estáveis e constantes, sem grandes flutuações (SCHUBERT *et al.*, 2004; YASSIN *et al.*, 2006). Além disso, uma única dose de undecanoato de testosterona, via i.m., em ratos, é capaz de manter níveis séricos fisiológicos de T por um mês (CALLIES *et al.*, 2003).

Nossos resultados demonstram que a orquiectomia bilateral diminuiu a quantidade de musculatura lisa no corpo cavernoso de ratos, bem como diminuiu o diâmetro peniano. A reposição hormonal tardia com undecanoato de testosterona (100 mg/kg), trinta dias após a orquiectomia, manteve a quantidade de musculatura lisa nas trabéculas do corpo cavernoso, bem como manteve o diâmetro peniano. Os outros parâmetros analisados, tais como

fibras elásticas, fibras colágenas, sinusóides, apoptose e NO não foram alterados em função da condição androgênica.

O papel relevante que a T exerce na função sexual masculina é demonstrado de forma categórica tanto em estudos epidemiológicos quanto em estudos experimentais (MILLS *et al.*, 1996; SHABSIGH, 1997; TRAISH *et al.*, 1999; JAIN *et al.*, 2000; TRAISH *et al.*, 2003; GREENSTEIN *et al.*, 2005; TRAISH *et al.*, 2007; GURBUZ *et al.*, 2008; TRAISH, 2009; MIRANDA *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos atuais demonstram que a reposição hormonal com testosterona permite que até 56% dos pacientes hipogonádicos recuperem de forma satisfatória sua função eretiva (JAIN *et al.*, 2000; GREENSTEIN *et al.*, 2005). Neste contexto, Aversa e colaboradores, em 2003, demonstraram que o fluxo arterial peniano pode ser melhorado de forma significativa pela administração de andrógenos. De forma similar, Foresta e colaboradores (2004) documentaram que a tumescência peniana noturna, o fluxo arterial cavernoso e as ereções visualmente estimuladas por situações eróticas podem ser significativamente melhoradas quando os níveis séricos de testosterona são normalizados. Além disso, estudos clínicos também demonstram que a administração de testosterona em homens hipogonádicos melhora a resposta às drogas inibidoras da PDE5 (SHABSIGH, 1997; AVERSA *et al.*, 2003; SHABSIGH, 2004).

No campo experimental, foi claramente demonstrado o papel relevante dos andrógenos sobre a anatomia ultraestrutural e sobre aspectos fisiológicos e funcionais do tecido eretivo peniano (TRAISH *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009; MIRANDA *et al.*, 2012). Além disso, diversos autores demonstraram que os andrógenos

apresentam um papel crítico na restauração e manutenção da estrutura trabecular do músculo liso cavernoso, bem como na função do mesmo (TRAISH *et al.*, 1999; TRAISH *et al.*, 2003; SHEN *et al.*, 2003; CLARO *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2012).

Neste sentido, Traish e colaboradores (1999) observaram que a castração cirúrgica reduziu significativamente a pressão intracavernosa bem como a quantidade de musculatura lisa presente no corpo cavernoso de coelhos submetidos à orquiectomia bilateral. Os mesmos autores observaram, ainda, que a reposição hormonal com T, sete dias após o procedimento cirúrgico, foi capaz de recuperar e estabilizar estes parâmetros aos níveis observados em animais controles. De forma semelhante, Shen e colaboradores (2003) demonstraram que a redução de fibras elásticas na túnica albugínea e a de fibras musculares lisas nos corpos cavernosos estavam associadas com a deficiência de testosterona.

Além disso, estudos mais recentes confirmam estes resultados (MIRANDA *et al.*, 2012). Miranda e colaboradores (2012) demonstraram que, mesmo um mês após a orquiectomia bilateral, a reposição hormonal tardia com T foi capaz de recuperar a musculatura lisa de animais orquiectomizados bilateralmente, sugerindo, portanto, que a T reverte os danos morfológicos causados pela ausência deste hormônio mesmo após um longo período de privação.

Nossos resultados corroboram com os dos autores acima mencionados, visto que ratos submetidos à orquiectomia bilateral apresentaram redução estatisticamente significativa na quantidade de músculo liso trabecular quando comparado à animais do grupo controle e à animais submetidos à reposição

hormonal trinta dias após a orquiectomia. Vale ressaltar que a quantidade de musculatura lisa no corpo cavernoso dos animais que foram submetidos à terapia de reposição hormonal foi semelhante a dos animais do grupo controle, reforçando a hipótese de que a T é capaz de interferir neste tecido.

Está bem estabelecido na literatura que a T desempenha um papel relevante na fisiologia da ereção, bem como é essencial para a integridade da musculatura lisa (MILLS *et al.*, 1996; SHABSIGH, 1997; TRAISH *et al.*, 1999; TRAISH *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009). Além disso, sabe-se que a musculatura lisa desempenha um papel fundamental na detumescência bem como na ereção peniana (ANDERSSON; WAGNER; 1995), além de estar intimamente associada à função veno-oclusiva, mecanismo hemodinâmico indispensável para a função erétil (NEHRA *et al.*, 1996; NEHRA *et al.*, 1998; TRAISH *et al.*, 2003; TRAISH, 2009). Estudos evidenciam que a diminuição de musculatura lisa promovida pela ablação androgênica pode desencadear a disfunção veno-oclusiva, por aumentar o escape venoso, comprometendo, assim, a função erétil adequada (LUE, 2000; LUE, 2012). Contribuindo para este quadro, o relaxamento inadequado da musculatura lisa compromete a expansão adequada dos sinusóides, também desencadeando disfunção veno-oclusiva, por falha na compressão do plexo venoso localizado sob a túnica albugínea (LUE, 2000; LUE, 2012).

Embora os estudos revelem uma íntima associação entre níveis séricos de T e a integridade morfológica e estrutural da musculatura lisa no corpo cavernoso, o mecanismo exato pelo qual os andrógenos modulam este tecido permanece desconhecida. Alguns autores afirmam que o decréscimo na quantidade de musculatura lisa no corpo cavernoso, em resposta à falta

androgênica, ocorra devido ao aumento da apoptose neste tecido (SHABSIGH, 1997; ZHANG *et al.*, 1999; TRAISH, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2004). Neste contexto, estudos experimentais têm demonstrado que a reposição hormonal com T previne a morte celular programada (apoptose), a qual é induzida pela ausência deste hormônio (ZHANG *et al.*, 1999), sugerindo, assim, que os andrógenos estejam envolvidos no controle da apoptose (KIESS *et al.*, 1998).

De fato, há diversos estudos na literatura destacando o papel dos andrógenos no controle da apoptose tecidual (KLEIN *et al.*, 1997; KIESS *et al.*, 1998; USER *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2004; MORIMOTO *et al.*, 2005; ESTRADA *et al.*, 2006; MOSTAFA *et al.*, 2010; VASCONSUELO *et al.*, 2011). Elegantes revisões realizadas por Kiess e colaboradores (1998) e, mais recentemente, por Vasconsuelo e colaboradores (2011), demonstraram que a T possui tanto efeitos anti-apoptóticos quanto pró-apoptóticos (KIESS *et al.*, 1998; VASCONSUELO *et al.*, 2011). Embora se desconheça o mecanismo exato pelo qual a T possui comportamentos ambíguos: ora de proteção contra a apoptose e ora de indução da mesma (VASCONSUELO *et al.*, 2011), trabalhos demonstram que o controle hormonal da morte celular programada é tecido-específico, depende da fase do ciclo celular na qual a célula se encontra, do ambiente onde a célula está inserida e da concentração de andrógenos circulantes (KIESS *et al.*, 1998; VASCONSUELO *et al.*, 2011).

De acordo com os nossos resultados, tanto a deprivação androgênica quanto a reposição hormonal tardia não influenciaram no grau de apoptose do corpo cavernoso. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos publicados por Yamamoto e colaboradores (2004), Nakazawa e colaboradores (2007) e por Lorenzetti e colaboradores (2012). Nakazawa e colaboradores

(2007) avaliaram os efeitos da castração e da reposição hormonal com T sobre a resposta apoptótica da bexiga urinária de ratos e não encontraram diferenças estatisticamente significativas no número de núcleos celulares marcados com o método de TUNEL (NAKAZAWA *et al.*, 2007). Embora o tecido avaliado por Nakazawa e equipe tenha sido diferente do nosso tecido (corpo cavernoso), é importante ressaltar que a metodologia do estudo acima citado é muito semelhante à nossa, ou seja, a reposição hormonal com T também começou quatro semanas após a castração, e os resultados são semelhantes. Ainda, é importante salientar que o nosso estudo é inédito na avaliação da apoptose no corpo cavernoso de ratos submetidos à ablação androgênica e à reposição hormonal após um longo período de tempo. A maioria dos estudos publicados na área avaliam outros tipos de tecidos, bem como utilizam técnicas de reposição hormonal aguda e não tardia, como realizado neste experimento.

Embora não tenhamos observado diferenças estatisticamente significativas no grau de apoptose entre os grupos, isto não necessariamente reflete a ausência de apoptose no corpo cavernoso, pois este fenômeno pode ter ocorrido em algum momento anterior, uma vez que a regulação da apoptose pela T é tempo-específica (KIESS *et al.*, 1998). Alguns estudos indicam que a apoptose tem sua elevação máxima por volta do segundo dia após um dano provocado no nervo cavernoso e que a taxa de células em apoptose voltam ao normal 14 dias após o dano no nervo (USER *et al.*, 2003). De forma semelhante, Yamamoto e colaboradores, em 2004, observaram um aumento no número de células apoptóticas no pênis cinco dias após orquiectomia bilateral e que o nível de apoptose se igualou aos níveis basais no décimo quarto e no vigésimo dia após a orquiectomia (YAMAMOTO *et al.*, 2004). Estes

resultados claramente indicam que a apoptose começa logo após a ausência de T, indicando que o pênis é um órgão que depende de níveis adequados deste hormônio para sua integridade morfológica (SHABSIGH, 1997).

Portanto, nossos resultados (diminuição na quantidade de musculatura lisa e a redução do diâmetro peniano observado em animais castrados quando comparado aos animais controle e aos animais com reposição hormonal) poderiam ser explicados pelo aumento de células apoptóticas em animais com deprivação androgênica. Esta apoptose teve seu início, provavelmente, logo após a falta deste hormônio, sendo seus níveis reestabelecidos após um determinado período de tempo. Isto explicaria, também, a ausência de diferença na taxa de apoptose encontrada no nosso estudo. Nossa hipótese vai ao encontro com os dados da literatura, pois estudos sugerem que o controle da apoptose feita pela T seja tempo-dependente (KIESS *et al.*, 1998).

A T não está apenas envolvida na regulação da morte celular programada, mas também está envolvida na regulação da proliferação e da diferenciação celular (SHABSIGH, 1997; SHABSIGH, *et al.*, 1998; BHASIN *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que a reposição hormonal, realizada 30 dias após a orquiectomia, manteve a quantidade de musculatura lisa no corpo cavernoso de ratos. Estes dados poderiam ser explicados devido ao aumento de síntese de DNA, induzido pela T (SHABSIGH, 1997; SHABSIGH, *et al.*, 1998). Além disso, estudos demonstram que a linhagem de células mesenquimais pluripotentes seguem um curso miogênico em situações nas quais os níveis séricos de T estão normais, pois os andrógenos induzem a síntese de proteínas miogênicas, tais como a MyoD e a cadeia pesada de miosina do tipo II (MHC) de maneira

dose-dependente (ANDERSSON; WAGNER; 1995; BHASIN *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2003). Observa-se ainda que o mecanismo de sinalização celular em resposta à estimulação de receptores de andrógenos desencadeia uma interação com a β -Catenina, uma proteína envolvida tanto na adesão quanto na sinalização celular, e com fator de transcrição celular 4 (TCF-4). Esta interação aumenta a síntese de folistatina, a qual, por sua vez, se liga à miostatina, antagonizando seu efeito (SINGH *et al.*, 2009). Sabe-se que a miostatina pertence ao grupo do Fator de Transformação Beta 1 (TGF- β 1) e sua principal função é inibir a diferenciação de células pluripotentes em células de linhagem miogênica, portanto, sua inibição resulta no aumento de células miogênicas (SINGH *et al.*, 2009). Tais afirmações direcionam para a hipótese de que a interação entre os mecanismos de sinalização celular oriundos da estimulação de receptores de andrógenos com os mecanismos de sinalização celular do TGF- β possuem um papel essencial na diferenciação da linhagem miogênica promovida pelos andrógenos (SINGH *et al.*, 2009).

Embora a maioria dos estudos tenham constatado a importância da musculatura lisa para o processo fisiológico da ereção, devemos levar em consideração o papel crítico e vital que as fibras elásticas e as fibras colágenas desempenham neste processo, pois estas estruturas participam tanto da tumescência quanto da detumescência peniana (PINHEIRO *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2006). Costa e colaboradores (2006) demonstraram que pacientes com DE severa possuem uma redução estatisticamente significativa na quantidade de fibras elásticas no corpo cavernoso quando comparado à pacientes sem esta disfunção (COSTA *et al.*, 2006). Todavia, os autores não correlacionaram este desfecho com níveis

séricos de T. Embora se tenha evidências clínicas de que a quantidade de fibras elásticas presentes no corpo cavernoso contribuem para o desenvolvimento da DE (COSTA *et al.*, 2006), este é o primeiro estudo que avaliou a quantidade de fibras elásticas do corpo cavernoso de ratos submetidos à ablação androgênica e submetidos à reposição hormonal, com o objetivo de verificar a influência da T na quantidade de fibras elásticas presentes no corpo cavernoso.

Neste sentido, Shen e colaboradores (2003) demonstraram que a deprivação androgênica reduziu a quantidade de fibras elásticas na túnica albugínea e que estas fibras eram substituídas por fibras colágenas (SHEN *et al.*, 2003), inferindo, assim, que, além do corpo cavernoso, a integridade e a função da túnica albugínea também sejam andrógeno dependentes (SHEN *et al.*, 2003). Porém, os autores não avaliaram a influência da T na quantidade de fibras elásticas no corpo cavernoso.

Nossos resultados sugerem que a T não influencia na quantidade de fibras elásticas do corpo cavernoso, uma vez que não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Este resultado corrobora com dados recentes da literatura publicados por Inoue e colaboradores (2012) (INOUE *et al.*, 2012). Estes autores avaliaram a biossíntese de hormônios sexuais na pele humana e encontraram que apenas a enzima aromatase estava intimamente relacionada com a biossíntese de estrógeno e com a formação de novas fibras elásticas e que a T não influenciou na biossíntese dessas fibras (INOUE *et al.*, 2012).

Em relação à quantidade de fibras colágenas no corpo cavernoso, nossos resultados revelam que não houve influência da T nos seus níveis.

Alguns fatores podem ser discutidos na tentativa de esclarecer os resultados obtidos nesta tese, pois eles contradizem os dados já publicados na literatura (SHEN *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2003). O primeiro aspecto a ser levado em consideração é a diferença de metodologia entre os estudos. A maioria deles utiliza reposição hormonal de forma aguda. O segundo aspecto importante é o modelo animal utilizado. Alguns estudos utilizam ratos e outros, coelhos. Porém, devemos observar que a estrutura histológica do corpo cavernoso de ratos difere da dos coelhos, visto que ratos possuem maior quantidade de fibras colágenas e os coelhos possuem maior concentração de fibras elásticas (PINHEIRO *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2006). Finalmente, os métodos de quantificação histomorfométrica utilizados são diferentes. Alguns estudos utilizam a grade M42, outros a planimetria (MIRANDA *et al.*, 2012) e outros, ainda, apenas qualificam a estrutura, sem quantificá-la.

Os dados da literatura tentam estabelecer o papel da T na produção de NO, porém os resultados são conflitantes e ainda geram muitos debates (TRAISH *et al.*, 1999; BABA *et al.*, 2000; TRAISH *et al.*, 2003; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009). Alguns autores sugerem que a expressão e a atividade da NOS, enzima envolvida na síntese do principal neurotransmissor envolvido na ereção peniana – o NO -, seja regulada pelos andrógenos (BABA *et al.*, 2000; TRAISH *et al.*, 2007; TRAISH, 2009). Em contrapartida, o mesmo grupo de pesquisadores afirma que a via do NO não é influenciada pelos níveis de andrógenos circulantes (TRAISH *et al.*, 1999; TRAISH *et al.*, 2003).

Nossos dados demonstraram que os níveis de NO, medidos de maneira indireta através da quantificação de nitritos e nitratos, não foi alterado com a presença ou ausência de T, sugerindo que este hormônio não interfere na via

do NO. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos realizados por Traish e colaboradores (1999; 2003) (TRAISH *et al.*, 1999; TRAISH *et al.*, 2003). Em seus experimentos, Traish e colaboradores (1999) concluíram que a deficiência androgênica e a reposição hormonal com T não foram capazes de alterar a expressão e a atividade da nNOS (TRAISH *et al.*, 1999). De maneira semelhante, o mesmo grupo de pesquisa concluiu, em outro trabalho, que a castração cirúrgica e a química não alteram a atividade da NOS, inferindo que a diminuição dos níveis de T circulantes não interfere na NOS (TRAISH *et al.*, 2003). A discussão, porém, continua e para explicar dados tão conflitantes na literatura serão necessárias mais investigações. Contudo, sugerimos que a diferença nos resultados é decorrente das diferentes metodologias empregadas para quantificar o NO, o que pode levar a resultados discrepantes.

Nosso estudo é pioneiro na avaliação da influência da T na quantidade de fibras elásticas bem como por avaliar a apoptose celular após um longo período de ablação androgênica e reposição hormonal tardia. Contudo, algumas limitações do nosso estudo devem ser levadas em consideração ao tentarmos extrapolar estes resultados a seres humanos. Primeiro: nós, e como a maioria dos estudos aqui citados, utilizamos modelos animais para investigar o papel da T na estrutura morfológica do corpo cavernoso. Porém, o corpo cavernoso do rato, modelo utilizado nesta tese, difere do corpo cavernoso do humano (PINHEIRO *et al.*, 2000) e por este motivo, a extrapolação dos resultados deve ser feita com muita cautela. Segundo: embora a castração cirúrgica não seja o modelo mais adequado para mimetizar o hipogonadismo, ela ainda é o método mais utilizado para estes fins (TEK *et al.*, 2010). Portanto, esta técnica não reflete com exatidão a condição clínica enfrentada pela

maioria dos homens. Neste contexto, nós sugerimos a criação de modelos animais que reflitam com maior acurácia as condições encontradas na prática clínica, para que possamos discutir, com maior clareza, quais alterações histomorfométricas teremos a partir da diminuição de T e como estas alterações contribuem para o desenvolvimento da DE.

6. CONCLUSÕES

Através dos experimentos desenvolvidos durante esta tese, pode-se concluir que:

- A orquiectomia bilateral diminuiu a quantidade relativa de musculatura lisa no corpo cavernoso de ratos; bem como reduziu o diâmetro peniano;
- A reposição hormonal tardia com undecanoato de T mantém a quantidade musculatura lisa no corpo cavernoso; e mantém o diâmetro peniano;
- A ablação androgênica, bem como a reposição hormonal não interferem na quantidade de fibras elásticas, de fibras colágenas, de espaço sinusoidal, na taxa de células em apoptose e nos níveis de NO do corpo cavernoso.

Em resumo, a testosterona, o principal hormônio sexual masculino, modula a resposta da musculatura lisa no corpo cavernoso de ratos.

7. PERSPECTIVAS

- Criar modelos animais de hipogonadismo para que, de fato, estes modelos mimetizem o que acontece na prática clínica;
- Estabelecer, a partir da criação dos modelos animais, qual é o momento específico (em qual nível de testosterona sérica), os danos no CC começam a surgir;
- Estabelecer, a partir da criação do modelo animal, qual é o momento específico (em qual nível de testosterona sérica) começa a apoptose no CC;
- Investigar a influência da testosterona sobre a expressão gênica e protéica de TGF- β 1.

8. REFERÊNCIAS

ABDO, Carmita HN. *et al.* Disfunção Erétil – Resultados do Estudo da Vida Sexual do Brasileiro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, nº 6, p. 424 – 429, 2006.

ANDERSON, Richard A; BAIRD, David T. Male Contraception. **Endocrine Reviews**, v. 23, nº 6, p. 735 - 762, Dec. 2002.

ANDERSSON, Karl-Erik; WAGNER, Gorm. The physiology of penile erection. **Physiological Reviews**, v. 75, nº 1, p. 191 – 236, Jan. 1995.

ANDERSSON, Karl-Erik. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. **The Journal of Urology**, v.170, p. S6 – S14, Aug. 2003.

ARAUJO, André B. *et al.* Does erectile dysfunction contribute to cardiovascular disease risk prediction beyond the Framingham Risk Score? **Journal of the American College of Cardiology**, v.55, nº 4, p.350 – 356, Jan. 2010.

AVERSA, Antonio *et al.* Androgens improve cavernous dilatation and response to sildenafil in patients with erectile dysfunction. **Clinical Endocrinology**, v. 58, nº 5, p. 632 – 638, May. 2003.

AYTAÇ, I.A. *et al.* The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU International**, v. 84, p. 50 – 56, 1999.

BABA, Katsuyuki *et al.* Delayed testosterone replacement restores nitric oxide synthase-containing nerve fibres and the erectile response in rat penis. **BJU International**, v. 85, nº 7, p. 953 – 958, May. 2000.

BHASIN, S. In: KRONENBERG, HM.; MELMED, S; POLONSKY, KS; LARSEN, RP (org). **Williams Textbook of Endocrinology**, 11thed, Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2008.

BHASIN, Shalender *et al.* The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. **The Journal of Gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 58, nº12, p. M1103 – M1110, Dec, 2003.

BILLUPS, KL. Erectile dysfunction as an early sign of cardiovascular disease. **International Journal of Impotence Research**, v. 17, p. S19 – S24, 2005.

BOWLES, Douglas *et al.* PKC δ mediates anti-proliferative, pro-apoptotic effects of testosterone on coronary smooth muscle. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 293, nº 2, p. C805 – C 813, Aug. 2007.

BURNETT, Arthur L. Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. **International Journal of Impotence Research**, v. 16, p. S15 – S19, 2004.

CALLIES, Frank *et al.* Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 111, nº 4, p. 203 – 208, Jun 2003.

CASTELA, Ângela *et al.* Testosterone, Endothelial Health and Erectile Function. **ISRN Endocrinology**, Article ID 839149, p. 1 – 7, 2011.

CHUNG, Benjamin I. *et al.* In: WEIN *et al.* **Campbell-Walsh Urology**. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2012. p. 55 – 70.

CLARO, Joaquim *et al.* Histomorphometry of penile smooth muscle fiber in severe erectile dysfunction. **São Paulo Medical Journal**, v. 23, nº 4, p. 181 – 186, Jul. 2005.

COOKE, Brian A. *et al.* Control of steroidogenesis in Leydig cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v.43, nº 5, p. 445 - 449, Oct. 1992.

COOKE, Brian A. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 151, nº 1- 2, p.25 - 35, May. 1999.

CORONA, Giovanni *et al.* Age-related changes in general and sexual health in middle-aged and older men: results from the European Male Ageing Study (EMAS). **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, nº 4 Pt 1, p. 1362 – 1380, Apr. 2010.

COSTA, Waldemar S *et al.* Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. **BJU International**, v. 97, nº 3, p. 567 – 569, Mar. 2006.

DOMENICE, Sorahia. *et al.* Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.46, nº4, p.433-443, 2002.

DONG, Q; HARDY, MP. Leydig cell function in man. In: WINTERS, SJ (ed). **Male hypogonadism, Basic, Clinical and Therapeutic principles**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. p.23-43.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, nº 4, p. 495 – 516, Jun. 2007.

ENGLISH, Hugh F. *et al.* Cellular-response to androgen depletion and repletion in the rat ventral prostate - autoradiography and morphometric analysis. **The Prostate**, v. 7, nº 1, p. 41 – 51, 1985.

ESTRADA, Manuel *et al.* Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, nº 35, p. 25492 – 25501, Sep. 2006.

EVANS, Gareth S.; CHANDLER, JA. Cell-proliferation studies in the rat prostate .2.The effects of castration and androgen-induced regeneration upon basal and secretory-cell proliferation.**The Prostate**, v. 11, nº 4, p. 339 – 351, 1987.

FELDMAN, Henry A. *et al.* Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, nº 2, p. 589 – 598, Feb. 2002.

FELDMAN, Henry *et al.* Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts male aging study. **The Journal of Urology**, v.151, nº 1, p. 54 - 61, Jan. 1994.

FORESTA, Carlo *et al.* Role of androgens in erectile function. **The Journal of Urology**, v. 171, nº 6 Pt 1, p. 2358 – 2362, Jun. 2004.

GHALAYINI, Ibrahim F. Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. **International Journal of Impotence Research**, v. 16, p. 459 – 469, 2004.

GIULIANO, F. New horizons in erectile and endotelial dysfunction research and therapies. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, p. S2 – S8, 2008.

GNESSI, Lúcio *et al.* Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment. **Endocrine Reviews**, v.18, nº4, p. 541 - 609, Aug. 1997.

GOOREN, LJ. Androgens and male aging: current evidence of safety and efficacy. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, nº 2, p. 136 – 151, Mar. 2010.

GREENSTEIN, Alexander *et al.* Does sildenafil combined with testosterone gel improve erectile dysfunction in hypogonadal men in whom testosterone supplement therapy alone failed. **The Journal of Urology**, v. 173, nº 2, p. 530 – 532, Feb. 2005.

GURBUZ, Nilgunet *al.* Hypogonadism and erectile dysfunction: an overview. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, nº 1, p. 36 – 43, 2008.

GUYTON, Arthur C; HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HEALY, Jeremiah C. In: STANDRING, S *et al.* **Gray`s Anatomy – The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 14th ed. Spain: Churchill Livingstone Elsevier, 2008.

INOUE, Takayoshi, *et al.* Sex steroid synthesis in human skin in situ: the roles of aromatase and steroidogenic acute regulatory protein in the homeostasis of human skin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 362, nº 1-2, p. 19 – 28, Oct. 2012.

JAIN, Pankajet *al.* Testosterone Supplementation for Erectile Dysfunction: Results of a Meta-Analysis. **The Journal of Urology**, v. 164, nº 2, p. 371 – 375, Aug. 2000.

JOHANNES, Catherine B. *et al.* Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **The Journal of Urology**, v.163, nº 2, p. 460 - 463, Feb. 2000.

JUNQUEIRA, Luiz C; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.414 – 430.

KIESS, W; GALLAHER B: Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, nº 5, p. 482 – 491, May. 1998.

KLEIN, Lonnie T. *et al.* Apoptosis in the rat penis after penile denervation. **The Journal of Urology**, v. 158, nº 2, p. 626 – 630, Aug. 1997.

KLONER, Robert A. *et al.* Erectile dysfunction in the cardiac patient: how common and should we treat? **The Journal of Urology**, v.170, p. S46 – S50, Aug. 2003.

LORENZETTI, Fábio *et al.* Low testosterone levels induce apoptosis via active 3-caspase dependent signaling in the bladder wall of male rats. **The Aging Male**, v. 15, nº 4, p. 216 – 219, Dec. 2012.

LUE, Tom F. Erectile Dysfunction. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, nº 24, p. 1802 – 1813, Jun. 2000.

LUE, Tom F. In: WEIN *et al.* **Campbell-Walsh Urology**. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2012. p. 688 – 720.

LUNENFELD, Bruno. The ageing male: demographic and challenges. **World Journal of Urology**, v. 20, nº 1, p. 11 – 16, May. 2002.

MAIA, RS. *et al.* Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum, and tunica albuginea in the rabbit penis. **International Journal of Impotence Research**, v. 18, nº 2, p. 121 – 125, Mar-Apr. 2006.

MILLS, Thomas M. *et al.* Androgens and Penile Erection: a review. **Journal of Andrology**, v. 17, nº 6, p. 633 – 638, Nov-Dec. 1996.

MIRANDA, Alexandre F. *et al.* Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. **Journal of Andrology**, v. 33, nº 6, p. 1224 – 1232, Nov-Dec. 2012.

MOORE, Keith L.; DALLEY II, Arthur F. AGUR, Anne M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MORIMOTO, S *et al.* Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. **Journal of Endocrinology**, v. 187, nº 2, p. 217 – 224, Nov. 2005.

MOSTAFA, Taymor *et al.* Testosterone and chronic sildenafil/tadalafil anti-apoptotic role in aged diabetic rats. **International Journal of Impotence Research**, v. 22, nº 4, p. 255 – 261, Jul-Aug. 2010.

MULHALL, John P. *et al.* Effect of Testosterone Supplementation on Sexual Function in Hypogonadal men with Erectile Dysfunction. **Urology**, v. 63, nº 2, p. 348 – 352, Feb. 2004.

NAKAZAWA, Ryuto *et al.* Effects of castration and testosterone administration on angiotensin II receptor mRNA expression and apoptosis-related proteins in rat urinary bladder. **Endocrine Journal**, v. 54, nº 2, p. 211 – 219, Apr. 2007.

NEHRA, Ajay *et al.* Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure. **The Journal of Urology**, v. 156, nº 4, p. 1320 – 1329, Oct. 1996.

NEHRA, Ajay *et al.* Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. **The Journal of Urology**, v. 159, nº 6, p. 2229 – 2236, Jun. 1998.

NIH consensus development panel on impotence. NIH Consensus Conference: Impotence. **JAMA**, v. 270, p. 83 - 90, 1993.

PANG, See-Tong *et al.* Gene expression profiling of androgen deficiency predicts a pathway of prostate apoptosis that involves genes related to oxidative stress. **Endocrinology**, v. 143, nº 12, p. 4897 – 4906, Dec. 2002.

PARKER, Keith L; SCHIMMER, Bernard P. Introdução à endocrinologia: o eixo hipotálamo-hipófise. In: BRUNTON, Laurence *et al.* **Goodman & Gilman's: As bases farmacológicas da terapêutica**. 12^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p.1103-1128.

PAYNE, Anita H.; YOUNGBLOOD, Geri L. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig Cells. **Biology of reproduction**, v. 52, nº 2, p. 217-225, Feb. 1995.

PINHEIRO, Ana C A D. *et al.* Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. **The Journal of Urology**, v.164, p. 1802 - 1806, Nov. 2000.

ROSS, Michael H; PAWLINA, Wojciech. **Histologia Texto e Atlas**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 798 – 842.

RUDOLFSSON, Stina H.; BERGH, Anders. Testosterone-stimulated growth of the rat prostate may be driven by tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha. **Journal of Endocrinology**, v. 196, nº 1, p. 11 – 19, Jan. 2008.

SCHUBERT, Michael *et al.* Intramuscular Testosterone Undecanoate: Pharmacokinetic Aspects of a Novel Testosterone Formulation during Long-term Treatment of Men with Hypogonadism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, nº 11, p. 5429 – 5434, 2004.

SHABSIGH, Ridwan. The effects of testosterone on the cavernous tissue and erectile function. **World Journal of Urology**, v.15, nº 1, p. 21 - 26, 1997.

SHABSIGH, Ridwan *et al.* Androgen induction of DNA synthesis in the rat penis. **Urology**, v. 52, nº 4, p. 723 – 728, Oct. 1998.

SHABSIGH, Ridwan. Testosterone Therapy in Erectile Dysfunction. **The Aging Male**, v. 7, nº 4, p. 312 - 318, Dec. 2004.

SHAMLOUL, Rany; GHANEM, Hussein. Erectile dysfunction. **Lancet**, v. 381, p. 153 – 165, Jan. 2013.

SHEN, Zhou-Jun *et al.* Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. **Asian Journal of Andrology**, v. 5, nº 1, p. 33 – 36, Mar. 2003.

SINGH, Rajanet *al.* Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. **Endocrinology**, v. 144, nº 11, p. 5081 – 5088, Nov. 2003.

SINGH, Rajanet *al.* Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ β -Catenin and Follistatin/Transforming Growth Factor- β signaling pathways. **Endocrinology**, v. 150, nº 3, p. 1259 – 1268, Mar. 2009.

SNYDER, Peter J. Androgênios. In: BRUNTON, Laurence *et al.* **Goodman & Gilman's: As bases farmacológicas da terapêutica**. 12^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p.1195 - 1208.

SWERDLOFF, RS; WANG, C. In: GOLDMAN, L; AUSIELLO, D. **Cecil – Textbook of Medicine**. 22nded. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders Elsevier, 2004. p.1472 - 1483.

TAM, Neville NC.*et al.* Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate - Involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. **American Journal of Pathology**, v. 163, nº 6, p. 2513 – 2522, Dec. 2003.

TEK, Mesut *et al.* The effect of testosterone replacement therapy on bladder functions and histology in orchiectomized mature male rats. **Urology**, v. 75, nº 4, p. 886 – 890, Apr. 2010.

TRAISH, Abdulmaged M. *et al.* Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. **Endocrinology**, v.140, nº 4, p. 1861 – 1868, Apr. 1999.

TRAISH, Abdulmaged M. *et al.* Effects of medical or surgical castration on erectile function in an animal model. *Journal of Andrology*, v. 24, nº 3, p. 381 – 387, May-Jun. 2003.

TRAISH, Abdulmaged M. *et al.* Adipocyte accumulation in penile corpus cavernosum of the orchiectomized rabbit: a potencial mechanism for veno-occlusive dysfunction in androgen deficiency. **Journal of Andrology**, v. 26, nº 2, p. 242 – 248, Mar-Apr. 2005.

TRAISH, Abdulmaged M. *et al.* Testosterone and erectile function: from basic research to a new clinical paradigm for managing men with androgen insufficiency and erectile dysfunction. **European Urology**, v. 52, nº 1, p. 54 – 70, Jul. 2007.

TRAISH, Abdulmaged M. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: a review. **Journal of Andrology**, v. 30, nº 4, p. 363 – 369, Jul- Aug. 2009.

TUREK, Paul J. In: WEIN *et al.* **Campbell-Walsh Urology**. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2012. p. 591 – 615.

USER, Herbert M. *et al.* Penile weight and cell subtype specific changes in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction. **The Journal of Urology**, v. 169, nº 3, p. 1175 – 1179, Mar. 2003.

VASCONSUELO, Andrea *et al.* Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. **Steroids**, v. 76, nº 12, p. 1223 – 1231, Nov. 2011.

VERMEULEN, Alex. Ageing, hormones, body composition, metabolic effects. **World Journal of Urology**, v. 20, nº 1, p. 23 – 27, May. 2002.

WANG, Christina *et al.* Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA, and ASA recommendations. **The Journal of Andrology**, v. 30, n° 1, p. 1 – 9, Jan-Feb. 2009.

WINTERS, SJ; DALKIN, AC. Neuroendocrine control of testicular function. In: WINTERS, Stephen J (ed). **Male hypogonadism, Basic, Clinical and Therapeutic principles**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. p.1-21.

YAMAMOTO, Hiroto *et al.* Penile apoptosis in association with p53 under lack of testosterone. **Urological Research**, v. 32, n° 1, p. 9 – 13; Feb. 2004.

YASSIM, Aksam A.; SAAD, Farid. Dramatic improvement of penile venous leakage upon testosterone administration. A case report and review of literature. **Andrologia**, v. 38, n° 1, p. 34 – 37, Feb. 2006.

ZHANG, XH. *et al.* Apoptosis in rat erectile tissue induced by castration. **Asian Journal of Andrology**, v. 1, n° 4, p. 181 – 185, Dec.1999.

ZHU, Meng-Lei, *et al.* TGF-beta signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer. **The Prostate**, v. 68, n° 3, p. 287 – 295, Feb. 2008.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Alterações histomorfométricas, grau de apoptose no músculo liso e expressão do fator de crescimento beta (TGF-beta1) ao nível de corpo cavernoso de ratos em deprivação androgênica submetidos ou não à terapia de reposição hormonal com testosterona.

Pesquisador Responsável Ernani Luís Rhoden

Parecer nº 182-06

Data da Versão 20/04/2006

Cadastro 09/1/06

Data do Parecer 08/06/2006

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Avaliar os efeitos histomorfométricos e mecanismos moleculares de apoptose envolvidos, assim como, a expressão do fator de crescimento beta (TGF-beta-1) no corpo cavernoso de ratos submetidos a ablação androgênica com ou sem reposição hormonal com testosterona.

Sumário do Projeto

Segundo os autores, a análise da microestrutura do corpo cavernoso é de grande importância para o entendimento de como ocorrem e quais são as diferenças em nível celular entre os processos erétil em indivíduos normogonádicos, hipogonádicos e hipogonádicos que foram submetidos a um tratamento de reposição hormonal com testosterona. A partir destes conhecimentos acredita-se ser possível o estabelecimento de medidas mais eficazes de tratamento de pacientes com este tipo de condição clínica, que afeta mais de 50% dos homens entre 40 e 90 anos de idade, em nosso meio. Além disto, este estudo permitirá compreender o papel dos andrógenos no fenômeno erétil. Para tal, serão utilizados 40 ratos Wistar machos com 5 meses de idade. Os animais serão divididos em 4 grupos de 10: Grupo 1 (controle) = sham operation; Grupo 2 (hipogonadismo) = orquiectomia bilateral sem reposição hormonal; Grupo 3 (hipogonadismo + testosterona imediata) = orquiectomia bilateral tratados com propionato de testosterona a 100mg/kg/mês, via s.c., por 60 dias; e Grupo 4 (hipogonadismo + testosterona tardia) = orquiectomia bilateral tratados com propionato de testosterona a 100mg/kg/mês; iniciando no 30º dia após o procedimento. Ao final de sessenta dias os animais serão anestesiados com Xilasina (20mg/mL e ketamina 60mg/mL com volume de 0,2mL/100g, via i.m. para a dissecação do pênis. As amostras de corpo cavernoso serão processadas em blocos de parafina e analisadas para determinação da espessura da túnica albugínea e conteúdo de fibras musculares, colágenas e elásticas. Será medida a expressão de TGF-beta1 com anticorpo anti-específico, bem como, o grau de apoptose do tecido muscular liso do corpo cavernoso, pela técnica de TUNEL.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Sim
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
- Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Os autores esclareceram que o orientador do projeto é o Dr. Ernani Rhoden.

Introdução	Adequada
-------------------	----------

Comentários sobre a Introdução

A introdução está bem escrita, com revisão bibliográfica adequada e recente.

Objetivos	Adequados
------------------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
----------------------------	--

Delineamento	Adequado
Tamanho da amostra	Total 40 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Crerios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos

Os autores esclareceram os seguintes pontos:

- 1) A escolha da dose de 100mg/kg/mês foi estabelecida conforme a literatura científica. Serão administradas as 100mg/kg em dois momentos, no mesmo dia da exérese testicular e 30 dias após este procedimento.
- 2) Os animais do Grupo 4 receberão 100mg/kg/mês 30 dias após a exérese testicular.
- 3) Os animais receberão analgesia a base de codeína no pós-operatório. Os animais permanecerão em gaiolas higienizadas (4 ratos/caixa), "recebendo todos os cuidados necessários e expostos à temperatura e iluminação necessários".
- 4) O método de eutanásia aplicado será sacrifício em capnula de monóxido de carbono, após a dissecação do pênis, ainda sob efeito da anestesia.
- 5) Foi corrigido o item "Aspectos Éticos": o projeto será submetido ao CEP da FFFCMPA.

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	jan-06
Data de término prevista	dez-06
Orçamento	Comentário
Fonte de financiamento externa	Não informado

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

- 1) O cronograma foi adequado, conforme solicitado.
- 2) O orçamento não cita o órgão financiador. Os autores descrevem, em carta resposta, que "o financiamento será realizado através de verba do edital universal (consultar Lattes)." Solicita-se a inclusão desta informação no projeto.

Referências Bibliográficas	Adequadas
-----------------------------------	------------------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Recomenda-se a inclusão da fonte de financiamento no corpo do projeto.


Edli C. Pulcinella
 Secretária do CEP/FFCMPA

Anexo 2 – Normas do periódico “*The Journal of Urology*”

The Journal of Urology® contains 4 sections: Adult Urology, Pediatric Urology, Investigative Urology and Urological Survey. Rapid Communications are welcomed. The **Adult and Pediatric Urology Sections (original articles)** usually do not publish laboratory animal studies. **The Investigative Urology Section (research articles)** does not publish clinically oriented articles, and does not require prior approval for Review Articles. Unsolicited material is not accepted for **Urological Survey**.

All communications concerning editorial matters should be sent to:

The Journal of Urology®

Publications Department

American Urological Association

1000 Corporate Boulevard

Linthicum, MD 21090

Telephone (410) 689-3922, FAX (410) 689-3906

e-mail: publications@auanet.org

MANUSCRIPT SUBMISSION. Authors must submit their manuscripts through the Web-based tracking system at <https://www.editorialmanager.com/ju> . The site contains instructions and advice on how to use the system, guidance on the creation/scanning and saving of electronic art, and supporting documentation. In addition to allowing authors to submit manuscripts on the Web, the site allows authors to follow the progression of their manuscript through the peer review process. Authors are asked **NOT** to mail hard copies of the manuscript to the editorial office. They may, however, mail to the editorial office any material that cannot be submitted electronically.

For potentially acceptable manuscripts, the period between receipt of all reviews and when an editorial decision is made is usually longer.

AUTHOR'S RESPONSIBILITY. Manuscripts must be accompanied by a cover letter, an [AUA Disclosure Form](#) and an [Author Submission Requirement Form](#) (see last page) signed by all authors. The letter should include the complete address, telephone number, FAX number and e-mail address of the designated corresponding author as well as the names of potential reviewers. The corresponding author is responsible for indicating the source of extra-institutional funding, in particular that provided by commercial sources, internal review board approval of study, accuracy of the references and all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

Manuscripts submitted without all signatures on all statements will be returned to the authors immediately. Electronic signatures are acceptable.

Authors are expected to submit complete and correct manuscripts. Due to the large number of high quality articles being submitted and to avoid significant delay in publication, the Editors find it necessary to insist that the length of manuscripts, and number of references and illustrations conform to the requirements indicated herein. No paper will be reviewed until these requirements are met. Published manuscripts become the sole property of *The Journal of Urology*® and copyright will be taken out in the name of the American Urological Association Education and Research, Inc.

All accepted NIH funded articles must be directly deposited to PubMed Central by the authors of the article for public access 12 months after the publication date.

PAGE PROOFS AND CORRECTIONS. The corresponding author will receive electronic page proofs to check the typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (eg, reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the editorial office.

It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the author's meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The editorial office reserves the right to disallow extensive alterations. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections faxed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Rapid Review Manuscripts that contain important and timely information will be reviewed by 2 consultants and the editors within 72 hours of receipt, and authors will be notified of the disposition immediately thereafter. **The authors must indicate in their submittal letter why they believe their manuscript warrants rapid review.** A \$250 processing fee should be forwarded with the manuscript at the time of submission. Checks should be made payable to the American Urological Association. If the editors decide that the paper does not warrant rapid review, the fee will be returned to the authors, and they may elect to have the manuscript continue through the standard review process. Payment for rapid review guarantees only an expedited review and not acceptance.

Original and Research Articles should be arranged as follows: Title Page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables, Legends. The title page should contain a concise, descriptive title, the names and affiliations of all authors, and a brief descriptive runninghead not to exceed 50 characters. One to five key words should be typed at the bottom of the title page. These words should be identical to the medical subject headings (MeSH) that appear in the Index Medicus of the National Library of Medicine. The abstract should not exceed 250 words and must conform to the following style: Purpose, Materials and Methods, Results and Conclusions.

References should not exceed 30 readily available citations for all articles (except Review

Articles). Self-citations should be kept to a minimum. References should be cited by superscript numbers as they appear in the text, and they should not be alphabetized. References should include the names and initials of the first 3 authors, the complete title, the abbreviated journal name according to the Index Medicus of the National Library of Medicine, the volume, the beginning page number and the year. References to book chapters should include names and initials of the first 3 chapter authors, chapter title, book title and edition, names and initials of the first 3 book editors, city of publisher, publisher, volume number, chapter number, page range and year. In addition to the above, references to electronic publications should include type of medium, availability statement and date of accession. The statistical methods should be indicated and referenced. Enough information should be presented to allow an independent critical assessment of the data.

Digital illustrations and tables should be kept to a necessary minimum and their information should not be duplicated in the text. No more than 10 illustrations should accompany the manuscript for clinical articles. Magnifications for photomicrographs should be supplied and graphs should be labeled clearly. Reference to illustrations, numbered with Arabic numerals, must be provided in the text. Blurry or unrecognizable illustrations are not acceptable. Visit <http://rapidinspector.cadmus.com/zww> for detailed instructions for digital art. The use of color is encouraged at no charge to the authors.

Tables should be numbered and referred to in the text. In general, they should present summarized rather than individual raw data. Due to page constraints caused by the large number of high quality manuscripts being submitted to *The Journal of Urology*, the editors find it necessary to offer publishing alternatives. Therefore, authors may be requested to post tables as supplementary material on their institution's website at no charge or on The *Journal* website at a per page rate of \$79. Authors may also elect to print their tables with the article at a per page rate of \$236.

Letters to the Editor should be useful to urological practitioners. The length should not exceed 500 words. Only Letters concerning articles published in the Journal within the last year are

considered.

Review Articles should not be submitted without prior approval. Queries for these articles should be accompanied by a detailed outline of the proposed article, an abstract not to exceed 750 words and an estimate of the length of the manuscript to be submitted. The format is the same as that of an Original Article.

Special Articles are scientific reports of original clinical research and state-of-the-art topics, and are designated as such by the Editors. The format is the same as that of an Original Article.

New Technology and Techniques feature high quality manuscripts that describe the innovative clinical application of new technology or techniques in all disciplines of urology, and are designated as such by the Editors. Addressing diagnosis or management of urological conditions, this feature covers the categories of 1) cutting-edge technology, 2) novel/modified techniques and 3) outcomes data derived from use of 1 and/or 2. The format is the same as that of an Original Article, although fewer words are preferred to allow more space for illustrations.

Opposing Views are submitted by invitation only.

Video Clips may be submitted for posting on The Journal web site. They are subject to peer review. Video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The size of each clip should not exceed 10MB. File size limitation is intended to ensure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to the web site and returned to the author for resubmission. For complete instructions e-mail: publications@auanet.org.

Anexo 3 – Autorização para o uso de imagens.

Autorização para o uso das Figuras 1 e 5

De: "Jones, Jennifer (ELS-OXF)" <J.Jones@elsevier.com>
Assunto: RE: Obtain Permission - Book request
Data: 30 de dezembro de 2013 06:59:22 BRST
Para: "grazihal@gmail.com" <grazihal@gmail.com>



Dear Grazielle Halmenschlager

We hereby grant you permission to reproduce the material detailed below at no charge **in your thesis, in print and on the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre web site and CAPES repositories**, and subject to the following conditions:

1. If a ny part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publ ication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publ ication, as follows:
"This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year)."
3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Re production of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than as specified above. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. S hould your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely

Jennifer Jones
Rights Associate

Elsevier Limited, a company registered in England and Wales with company number 1982084, whose registered office is The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom.

From: grazihal@gmail.com [mailto:grazihal@gmail.com]
Sent: 21 December 2013 16:03
To: Rights and Permissions (ELS)
Subject: Obtain Permission - Book request

Title:	M.Sc
First name:	Grazielle
Last name:	Halmenschlager
Institute/company:	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Address:	245, Sarmento Leite street
Post/Zip Code:	90050-170
City:	Porto Alegre
Country:	Brazil
Telephone:	55 51 92016679
Email:	grazihal@gmail.com

Please select the type of publication:	Book
Book - Title:	Campbell-Walsh Urology
Book - ISBN:	9781146069119
Book - Author(s):	Alan J. Wein; Louis R Kavoussi et al
Book - Year:	2012
Book - Pages from:	689
Book - Page to:	720
Book - Chapter Num:	23
Book - Chapter Title:	Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction

I would like to use (please select one of the following options):	Figure(s)
If using figures/tables or illustrations please specify the quantity:	2; Figure 23-1 and Figure 23-5
Are you the author of the material?:	No
If not, is the author involved with your project:	No
In what format will you use the material?:	Print and Electronic
Will you be translating the material?:	No
Information about your proposed use:	thesis
Proposed use text:	Posting in a repository - Library and CAPES repository
Additional comments/information:	Deadline: January, 5th

Autorização para o uso da Figura 3

Rightslink Printable License

06/01/14 23:28

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 06, 2014

This is a License Agreement between Grazielle Halmenschlager ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3292231323310
License date	Dec 18, 2013
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	International Journal of Impotence Research
Licensed content title	Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility
Licensed content author	I F Ghalayini
Licensed content date	Jul 1, 2004
Volume number	16
Issue number	6
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Alterações histomorfométricas e grau de apoptose no corpo cavernoso de ratos em deprivação androgênica submetidos ou não a reposição hormonal com Testosterona
Expected completion date	Jan 2014
Estimated size (number of pages)	121
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501185631.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

Autorização para o uso das Figuras 4 e 6

Welcome Guest | [Renew, Subscribe or Create Account](#) | [Sign In](#)



SUBSCRIBE OR RENEW TODAY »

[HOME](#) | [ARTICLES & MULTIMEDIA](#) | [ISSUES](#) | [SPECIALTIES & TOPICS](#) | [FOR AUTHORS](#) | [CME](#)

Keyword, Title, Author, or Citation  [Advanced Search](#)

About NEJM Permissions

Submit Your Permission Request Using Rightslink

If you are seeking permission to copy/reproduce/republish content from NEJM and are not the author of that content, you may use the Copyright Clearance Center's Rightslink® service. Simply visit NEJM.org and locate the article from which you seek to reuse content.

Once you have located and accessed the article you are looking for on NEJM.org:

- Click on the Permission link in the article toolbox (if you are looking at the full-text), or click on the Permissions link in the middle of the page (if you are viewing the abstract or first 100 words of the article because you don't have a subscription)
- The RightsLink® window will pop up, with information about content you have selected.
- Follow the prompts to obtain a free price quote OR
- Sign-in to your existing RightsLink® account, or create an account if you do not already have one, and follow the prompts to secure permission

Confirmation of your permission and a copy of the permission terms and conditions will be sent to you instantly via e-mail for most requests. Some requests may require Publisher review.

If you have questions about using the Rightslink® service, please contact Rightslink® Customer Support at (877) 622-5543 (toll free) or (978) 777-9929, or e-mail customer@copyright.com.

For other general questions about NEJM Permissions, e-mail permissions@nejm.org.

Permission for Authors

If you are the author of the article that was published in The New England Journal of Medicine ("NEJM"), please visit the [NEJM Author Center](#).

Reuse of Content within a Thesis or Dissertation

Content (full-text or portions thereof) may be used in print and electronic versions of your dissertation or thesis without formal permission from the Massachusetts Medical Society, Publisher of the New England Journal of Medicine.

The following credit line must be printed along with the copyrighted material:

"Reproduced with permission from (scientific reference citation), Copyright Massachusetts Medical Society.

Third-Party Content

Grants of permissions apply only to copyrighted material that the MMS owns, and not to copyrighted text or illustrations for other sources.

Prohibited Uses

The New England Journal of Medicine (and its logo design) are registered trademarks of the Massachusetts Medical Society. We do not grant permission for our logo, cover or brand identity to be used in materials. Permission will not be granted for photographs depicting identifiable individuals.

NEJM Information

- [Past and Present](#)
- [Editors and Publishers](#)
- [Editorial Policies](#)
- [Permissions](#)
- [Reprints](#)
- [Upcoming Medical Conventions](#)
- [Privacy Policy](#)
- [Cookie Information](#)
- [Terms of Use](#)
- [Copyright Information](#)
- [Frequently Asked Questions](#)
- [Help Index](#)
- [Contact Us](#)

Content and Features

- [Overview](#)
- [Mobile](#)
- [What's New at NEJM.org?](#)

Subscriptions and Access Options

- [Products and Services Overview](#)
- [Online Access Levels](#)
- [Access from Outside the U.S.](#)

Continuing Medical Education

- [Program Overview](#)
- [Weekly CME Program](#)
- [Review CME Program](#)

Information For

- [Advertisers](#)
- [Authors](#)
- [Institutions](#)
- [Media](#)
- [Subscribers](#)



Sign up for FREE »
Alerts and Updates



Animated summaries of original research – FREE!

Succinct.

Lively.

Informative.

SELECT & PLAY NOW »

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

CONTENT: [Home](#) | [Current Issue](#) | [Articles](#) | [Issue Index](#) | [Specialties & Topics](#) | [Multimedia & Images](#) | [Archive 1812-1989](#)

INFORMATION FOR: [Authors](#) | [Reviewers](#) | [Subscribers](#) | [Institutions](#) | [Media](#) | [Advertisers](#)

SERVICES: [Subscribe](#) | [Renew](#) | [Pay Bill](#) | [Activate Subscription](#) | [Create or Manage Account](#) | [Alerts](#) | [RSS & Podcasts](#) | [Submit a Manuscript](#) | [Mobile](#)

RESOURCES: [Physician Jobs](#) | [Reprints](#) | [Permissions](#) | [Medical Meetings](#) | [Conventions](#) | [FAQs](#) | [NEJM Journal Watch](#) | [Help](#) | [Contact Us](#)

NEJM: [About](#) | [Product Information](#) | [Editors & Publishers](#) | [200th Anniversary](#) | [Terms of Use](#) | [Privacy Policy](#) | [Copyright](#) | [Advertising Policies](#) | [NEJM Group](#)

CME: [Weekly CME Program](#) | [Browse Weekly Exams](#) | [Your CME Activity](#) | [Purchase Exams](#) | [Review CME Program](#)

COMMENTS + QUESTIONS?
Send us your feedback

Autorização para o uso da Figura 7

De: "Jones, Jennifer (ELS-OXF)" <J.Jones@elsevier.com>
 Assunto: RE: Obtain Permission - Book request
 Data: 30 de dezembro de 2013 07:26:22 BRST
 Para: "grazihal@gmail.com" <grazihal@gmail.com>



Dear Grazielle Halmenschlager

We hereby grant you permission to reproduce the material detailed below at no charge **in your thesis, in print and on the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre web site and CAPES repositories**, and subject to the following conditions:

1. If a ny part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publ ication, as follows:
 "This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year)."
3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than as specified above. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. S hould your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely

Jennifer Jones
 Rights Associate

Elsevier Limited, a company registered in England and Wales with company number 1982084, whose registered office is The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom.

From: grazihal@gmail.com [mailto:grazihal@gmail.com]
 Sent: 21 December 2013 22:51
 To: Rights and Permissions (ELS)
 Subject: Obtain Permission - Book request

Title:	M.Sc.
First name:	Grazielle
Last name:	Halmenschlager
Institute/company:	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Address:	245, Sarmento Leite street
Post/Zip Code:	90050-170
City:	Porto Alegre
Country:	Brazil
Telephone:	55 51 92016679
Email:	grazihal@gmail.com

Please select the type of publication:	Book
Book - Title:	Campbell-Walsh Urology
Book - ISBN:	978-1-1460-691 1-9
Book - Author(s):	Alan J. Wein; Louis R Kavoussi et al
Book - Year:	2012
Book - Pages from:	591
Book - Page to:	615
Book - Chapter Num:	20
Book - Chapter Title:	Male Reproductive Physiology

I would like to use (please select one of the following options):	Figure(s)
If using figures/tables or illustrations please specify the quantity:	1
Are you the author of the material?:	No
If not, is the author involved with your project:	No
In what form will you use the material?:	Print and Electronic
Will you be translating the material?:	No
Information about your proposed use:	thesis
Proposed use text:	Institution's Library and CAPES repositories
Additional comments/Information:	Deadline: January, 5th

Autorização para o uso da Figura 8

Rightslink Printable License

06/01/14 23:53

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 06, 2014

This is a License Agreement between Grazielle Halmenschlager ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Grazielle Halmenschlager
Customer address	Rua Dona Rafaela, 319 apto 501 Canoas, other 92020-030
License number	3292230281501
License date	Dec 18, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Molecular and Cellular Endocrinology
Licensed content title	Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis
Licensed content author	Brian A. Cooke
Licensed content date	25 May 1999
Licensed content volume number	151
Licensed content issue number	1-2
Number of pages	11
Start Page	25
End Page	35
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No

Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Alterações histomorfométricas e grau de apoptose no corpo cavernoso de ratos em deprivação androgênica submetidos ou não a reposição hormonal com Testosterona
Expected completion date	Jan 2014
Estimated size (number of pages)	121
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. **Reservation of Rights:** Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. Translation: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. Website: The following terms and conditions apply to electronic reserve and author websites:

Electronic reserve: If licensed material is to be posted to website, the web site is to be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course if:

This license was made in connection with a course.

This permission is granted for 1 year only. You may obtain a license for future website posting.

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com> , and

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

17. Author website for journals with the following additional clauses:

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image, and the permission granted is limited to the personal version of your paper. You are not allowed to download and post the published electronic version of your article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> . As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

18. Author website for books with the following additional clauses:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.

A hyper-text must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

19. **Website** (regular and for author): A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. or for books to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>

20. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

21. **Other Conditions**:

v1.6

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501185621.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

Autorização para o uso da Figura 9

De: "Jones, Jennifer (ELS-OXF)" <J.Jones@elsevier.com>
 Assunto: RE: Obtain Permission - Book request
 Data: 30 de dezembro de 2013 07:24:39 BRST
 Para: "grazihal@gmail.com" <grazihal@gmail.com>



Dear Grazielle Halmenschlager

We hereby grant you permission to reproduce the material detailed below at no charge **in your thesis, in print and on the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre web site and CAPES repositories**, and subject to the following conditions:

1. If a ny part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publ ication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publ ication, as follows:
 "This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year)."
3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Re production of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than as specified above. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. S hould your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely

Jennifer Jones
 Rights Associate

Elsevier Limited, a company registered in England and Wales with company number 1982084, whose registered office is The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom.

From: grazihal@gmail.com [mailto:grazihal@gmail.com]
 Sent: 21 December 2013 22:03
 To: Rights and Permissions (ELS)
 Subject: Obtain Permission - Book request

Title:	M.Sc
First name:	Grazielle
Last name:	Halmenschlager
Institute/company:	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Address:	245, Sarmento Leite street
Post/Zip Code:	90050-170
City:	Porto Alegre
Country:	Brazil
Telephone:	55 51 92016679
Email:	grazihal@gmail.com

Please select the type of publication:	Book
Book - Title:	Cecil - Textbook of Medicine
Book - ISBN:	9780721639307
Book - Author(s):	GOLDMAN, L; AUSIELLO, D
Book - Year:	2004
Book - Pages from:	1473
Book - Page to:	1473
Book - Chapter Num:	247
Book - Chapter Title:	The testis and male sexual function

I would like to use (please select one of the following options):	Figure(s)
If using figures/tables or illustrations please specify the quantity:	1; Figure 247-4; page 1473
Are you the author of the material?:	No
If not, is the author involved with your project:	No
In what format will you use the material?:	Print and Electronic
Will you be translating the material?:	No
Information about your proposed use:	thesis
Proposed use text:	Institution's Library and CAPES repository
Additional comments/ information:	Deadline: January, 5th