



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

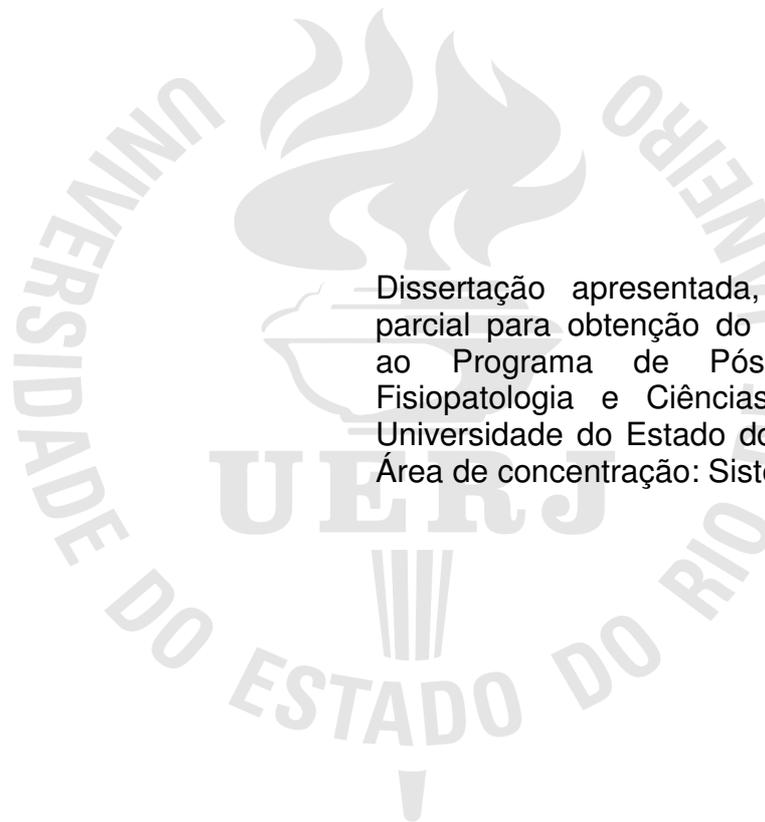
Alexandre de Freitas Miranda

**Efeitos da castração e reposição hormonal tardia no tecido erétil do  
pênis de ratos Sprague-Dawley**

Rio de Janeiro  
2009

Alexandre de Freitas Miranda

**Efeitos da castração e reposição hormonal tardia no tecido erétil do penis de ratos Sprague-Dawley**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

M672 Miranda, Alexandre de Freitas.  
Efeitos da castração e reposição hormonal tardia no tecido erétil do  
pênis de ratos Sprague-Dawley / Alexandre de Freitas Miranda. - 2009.  
54 f.

Orientador : Francisco José Barcellos Sampaio.

Coorientador : Waldemar Silva Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio  
de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em  
Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Pênis - Teses. 2. Testosterona - Teses. 3. Andropausa - Teses. 4.  
Colágeno - Teses. 5. Músculo liso - Teses. 6. Rato como animal de  
laboratório - Teses. I. Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Costa,  
Waldemar Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.188

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Alexandre de Freitas Miranda

**Efeitos da castração e reposição hormonal tardia no tecido erétil do pênis de ratos Sprague-Dawley**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema Urogenital

Aprovado em 23 de março de 2009.

Orientador:

---

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Enrico Andrade  
Faculdade de Medicina - USP

---

Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2009

## RESUMO

Miranda, Alexandre. *Efeitos da castração e reposição hormonal tardia no tecido erétil do pênis de ratos Sprague-Dawley*. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Estudos em animais e humanos sugerem que níveis adequados de testosterona são necessários para preservar a integridade do tecido erector peniano. Nenhum estudo prévio confirmou se as mudanças estruturais são reversíveis após longo período de deprivação hormonal. Foi proposto a avaliação, através de métodos quantitativos, as alterações estruturais no corpo cavernoso de ratos submetidos à castração cirúrgica; bem como o papel da reposição hormonal tardia na reversão das possíveis alterações estruturais. Foram usados 25 ratos Sprague-Dawley machos com aproximadamente 12 semanas de idade. Os animais foram divididos em 5 grupos compostos por 5 animais em cada grupo e tratados da seguinte forma: **ORQ1** = Grupo submetido à orquiectomia e sacrificado após 1 mês. **C1** - Grupo controle morto após 1 mês. **ORQ2** - Grupo orquiectomizado e morto após 2 meses. **C2** - Grupo controle morto após 2 meses. **T** – Grupo orquiectomizado que recebeu, após 1 mês, suplementação com undecanoato de testosterona na dose de 100mg/ Kg subcutâneo. Após 1 mês de reposição hormonal os animais foram mortos. No Resultado Houve uma redução significativa no valor absoluto do colágeno, músculo liso, espaço sinusoidal e área total do corpo cavernoso após 2 meses no grupo castrado, quando comparado ao controle. Em termos gerais a densidade não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos. A reposição hormonal com testosterona foi capaz de reverter as alterações observadas, demonstrando um aumento dos elementos estudados. A metodologia utilizada permitiu mostrar que valores absolutos demonstram melhor o que de fato ocorre com os elementos observados, eliminando um viés de análise, quando se consideram os valores relativos. Esses resultados sugerem que a reposição, mesmo quando realizada tardiamente, foi eficaz na reversibilidade das alterações geradas pela castração.

Palavras-chave: Pênis. Testosterona. Andropausa. Colágeno. Músculo liso. Rato.

## ABSTRACT

**Introduction.** Studies in animals and humans have suggested that adequate levels of testosterone are necessary to preserve the integrity of penile erectile tissue. No previously reported studies have confirmed if these structural changes are reversible following long-term hormonal deprivation.

To evaluate, through quantitative methods, the structural alterations in the corpora cavernosa of rats submitted to surgical castration as well as the role of late hormone replacement in reversing the possible structural alterations. We used 25 male Sprague-Dawley rats who were approximately 12 weeks of age. The animals were divided into 5 groups composed of 5 animals each and treated as follows. ORCHIEC-1 = group that underwent orchiectomy and were sacrificed after 1 month, C-1 = control group sacrificed after 1 month, ORCHIEC-2 = group that underwent orchiectomy and were sacrificed after 2 months, C-2 = control group sacrificed after 2 months, T = group that underwent orchiectomy, and after 1 month underwent testosterone replacement with a subcutaneous single dose of testosterone undecanoate at 100 mg/kg (T); after 1 month of hormonal replacement, the animals were sacrificed. Quantification of smooth muscle, collagen and elastic system fibers in controls and rats submitted to orchiectomy alone and with late hormonal replacement. There were a significant decrease in the absolute values of collagen, smooth muscle, sinusoidal space and total area of corpora cavernosa after 2 months in the castrated group when compared with controls. Overall, as regards density, no significant differences were observed among the groups. The hormonal replacement with testosterone was able to reverse the alterations observed, demonstrating an increase in the elements studied. The method used for this research allowed demonstrating that absolute values are reliable to quantify the structural alterations of corpora cavernosa structures. The results suggest that hormonal replacement, even when instituted at a late stage, is effective in reversing the corpora cavernosa alterations produced by castration.

**Key words:** Penis. Testosterone. Andropause. Collagen. Smooth muscle. Rat

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM –	Androgen Deficiency of the Aging Male
C1 –	Grupo controle morto após 1 mês
C2 –	Grupo controle morto após 2 meses
DAEM –	Deficiência Androgênica do Envelhecimento Masculino
DSE –	Disfunção Sexual Erétil
NO –	Óxido Nítrico
ORQ1 –	Grupo submetido à orquiectomia e sacrificado após 1 mês
ORQ2 –	Grupo orquiectomizado e morto após 2 meses
PDE5 –	Fosfodiesterase 5
REM –	Rapid eye movement
T –	Grupo orquiectomizado que recebeu, após 1 mês, suplementação com undecanoato de testosterona. Após 1 mês de reposição hormonal os animais foram mortos

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	09
1	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
1.1	<b>Procedimento cirúrgico</b> .....	13
1.2	<b>Suplementação com testosterona</b> .....	14
1.3	<b>Obtenção do material</b> .....	14
1.4	<b>Histoquímica e imunohistoquímica</b> .....	15
1.5	<b>Análise do material</b> .....	16
1.5.1	<u>Colágeno</u> .....	16
1.5.2	<u>Espaço sinusoidal</u> .....	20
1.5.3	<u>Músculo liso</u> .....	22
1.5.4	<u>Área total do corpo cavernoso</u> .....	24
1.5.5	<u>Densidade</u> .....	25
1.6	<b>Análise estatística</b> .....	25
2	<b>RESULTADOS</b> .....	26
3	<b>DISCUSSÃO</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33
	<b>APÊNDICE - Effects of Castration and Late Hormonal Replacement in the Structure of Rat Corpora Cavernosa</b>	38

## INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo rapidamente, juntamente com sua expectativa de vida. Ao mesmo tempo observa-se uma redução na taxa de fertilidade. Estas mudanças juntas tem como resultado o envelhecimento da população mundial. Apesar do enorme progresso da medicina nas últimas décadas a velhice vem acompanhada de doenças e incapacidades que resultam em baixa qualidade de vida.

A capacidade para manter um estilo de vida ativa e independente, tanto quanto possível, é um fator importante que deve ser preservado na velhice<sup>1</sup>. A indústria tomou consciência da sua importância e enorme potencial numa população de homens mais idosos, que passam dos 50 anos. Simultaneamente e por conseqüência disso o campo das pesquisas e o número de trabalhos relacionados às alterações hormonais no envelhecimento masculino aumentou consideravelmente despertando cada vez mais o interesse da comunidade médica e parte do público leigo.

O hipogonadismo é uma condição clínica em que baixos níveis de testosterona são encontrados em associação com sinais e sintomas específicos. Quando o hipogonadismo ocorre em homens idosos, a condição é geralmente chamada de andropausa ou **Deficiência Androgênica do Envelhecimento Masculino (DAEM)**, também referida pela sigla em inglês **ADAM (Androgen Deficiency of the Aging Male)**. Estima-se que o hipogonadismo afete 6% da população masculina aos 40 anos e 12,3% aos 69anos<sup>2</sup>. Somente nos Estados Unidos da América temos aproximadamente 2.4 milhões de pessoas com DAEM. A manifestação clínica do hipogonadismo secundário masculino tem sido bem definido acima dos 50 anos, mas a terapia de reposição hormonal não foi amplamente aceita, em parte devido às expectativas não satisfeitas, aos efeitos colaterais e riscos possíveis.

Em relação à ereção peniana, desde que a testosterona se tornou disponível no arsenal terapêutico, notou-se seu poderoso efeito sobre a função sexual masculina. Nos primeiros estudos sobre o assunto, a ereção espontânea, principalmente a que ocorre na fase noturna (fase REM), era considerada androgênio-dependente. Entretanto a ereção por estímulo sexual

(visual ou táctil) não tinha correlação<sup>3,4</sup>. Isto resultou na hipótese de que o circuito neural que atende à ereção noturna é diferente do que atende à ereção por estímulo direto, respondendo de forma diferente à testosterona. O estudo original, entretanto monitorou apenas a circunferência peniana e não a rigidez<sup>3</sup>. Observações posteriores demonstraram que a testosterona realmente afeta a resposta peniana à estímulos eróticos, com interferências na duração, rigidez máxima e velocidade de detumescência<sup>5,6</sup>. Estas observações não modificaram a visão de que o principal alvo de ação do androgênio no homem era o interesse sexual<sup>3</sup>. Acreditava-se que a influência androgênica no pênis era indireta, através do efeito na libido e não um efeito direto no tecido peniano. Este conceito vem sendo revisto com o surgimento de novos conhecimentos que sugerem que a testosterona desempenha um papel importante na fisiologia erétil.

O nível de testosterona crítico para a restauração da libido varia entre indivíduos e está entre 60% a 70% do valor de referência de homens eugonadais<sup>7-10</sup>. É preciso ressaltar que essa observação foi realizada em homens de diferentes idades. Conseqüentemente podemos inferir que homens com disfunção sexual erétil (DSE) e níveis de testosterona abaixo do normal, como nos idosos, não se beneficiariam com a suplementação de testosterona. Porém, autores como Schiavi<sup>11</sup>, baseados em vasta experiência clínica levantaram a hipótese de que o nível para a ação biológica da testosterona, em pacientes idosos, deve ser mais elevado do que nos jovens. Recentemente essa hipótese foi confirmada experimentalmente por Gray *et al*<sup>12</sup>, mostrando que no idoso a libido e a função erétil respondem apenas a níveis elevados de testosterona circulante, comparado à população jovem.

A utilização da injeção intracavernosa, com relaxantes da musculatura lisa intracavernosa, como a papaverina e a prostaglandina E1, foram um avanço importante no tratamento da DSE. O surgimento do inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) possibilitou o tratamento efetivo da DSE de forma não invasiva. A identificação de novas vias na fisiologia da ereção e a descoberta da importância do óxido nítrico (NO) e seus efeitos embasaram a pesquisa para o desenvolvimento desta nova medicação<sup>13,14</sup>. A introdução de medicações de alta eficácia e relativa segurança, como os inibidores da PDE5, teve profundo impacto no tratamento da DSE. Pacientes que falharam na resposta aos

tratamentos de reposição androgênica puderam ser tratados com sucesso usando o inibidor de PDE5.

Apesar da euforia em relação aos medicamentos para a DSE e a segurança no uso dos inibidores da PDE5, aproximadamente 50% dos pacientes descontinuaram seu tratamento<sup>15,16</sup>. A razão para se descontinuar o uso da medicação reside numa avaliação incompleta da DSE, que está muitas vezes ligada a fatores orgânicos, como diabetes melitus, cardiopatias, neuropatias, tabagismo<sup>15,16</sup> ou doenças psicológicas. No Brasil outro fator que não pode ser esquecido é a baixa condição econômica dos pacientes, que não conseguem pagar pela medicação.

A grande maioria dos homens que falharam na resposta ao tratamento com inibidores da PDE5 parece possuir uma deficiência de testosterona. Todos os estudos sobre DSE concordam que a idade é o fator preponderante na etiologia da DSE<sup>2</sup>.

Nos últimos 15 anos a redução da testosterona relacionada à idade recebeu uma grande atenção. Seu significado patofisiológico ainda é muito debatido<sup>17</sup>. Dois fatores: o aumento da DSE com a idade e a queda da testosterona com a idade fazem com que se reconsidere o significado da testosterona na DSE.

Além disso, novas pesquisas apresentaram evidências convincentes de que a testosterona possui um efeito significativo no tecido peniano, com envolvimento nos mecanismos da ereção. Sua deficiência altera a anatomia e fisiologia erétil. Esses estudos concluíram que o potencial terapêutico pleno do inibidor da PDE5 só pode ser alcançado em pacientes eugonadais.

Durante a ereção o pênis age como um capacitor, acumulando sangue sob pressão<sup>18,19</sup>. A dilatação do leito vascular peniano fornece fluxo e pressão para o corpo cavernoso. O relaxamento do músculo liso trabecular permite a expansão dos espaços lacunares, aprisionando sangue com a compressão das veias de drenagem<sup>18,19</sup>. Quando o corpo cavernoso está totalmente relaxado a pressão intracavernosa é dependente da pressão da artéria cavernosa. O músculo liso trabecular é uma estrutura peniana importante que contribui com a ereção e detumescência peniana<sup>18</sup>.

Neurotransmissores e substâncias vasoativas, como o óxido nítrico (NO), realizam o controle local do tônus do músculo liso trabecular. A função

erétil é assim dependente da integridade das estruturas que compõem o corpo cavernoso e a integração e regulação ficam por conta dos neurotransmissores e os agentes vasoativos com seus receptores<sup>18</sup>. Qualquer desequilíbrio entre a proporção de tecido conectivo e o músculo liso cavernoso<sup>20</sup> ou um desarranjo na integração dos sinais intercelulares de sinalização, causadas por mudanças na expressão de receptores ou suas funções, podem causar DSE. A castração pode alterar a quantidade de músculo liso trabecular, neurotransmissores e seus receptores, resultando em uma alteração na função erétil.

Estudos realizados em animais e em seres humanos sugeriram que a testosterona é necessária para manter a integridade das estruturas anatômicas do tecido eretor peniano. Além disso, ela é importante nos mecanismos bioquímicos envolvidos na ereção.

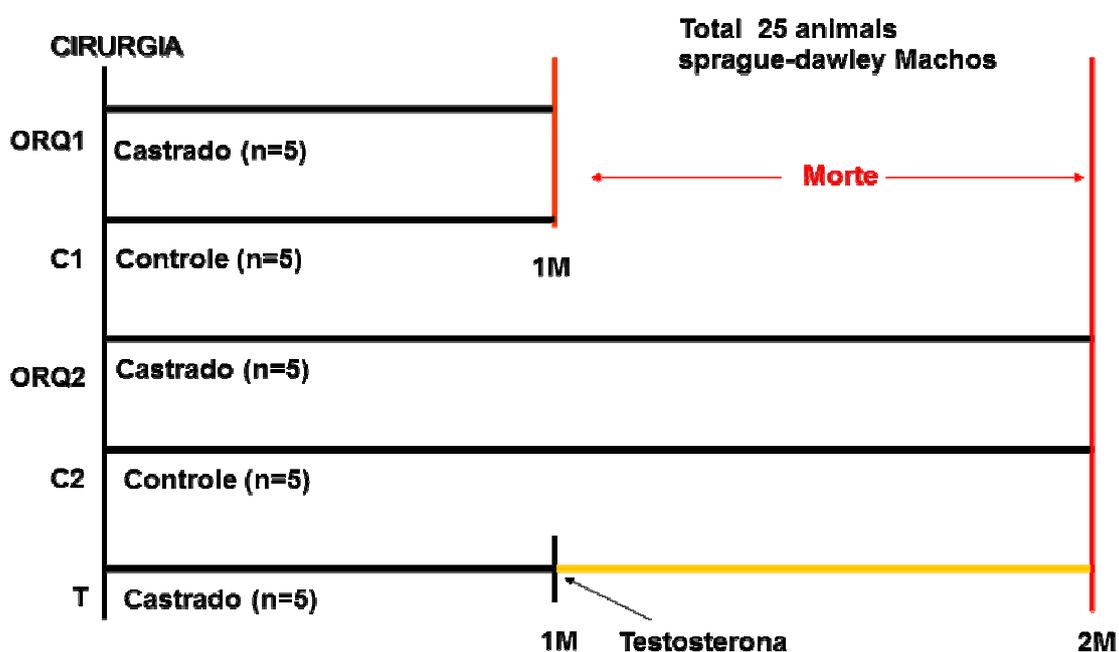
Shen *et al*<sup>21</sup> demonstraram que a privação de androgênio causa perda das fibras elásticas na túnica albugínea e de músculo liso no corpo cavernoso, sendo substituídos por fibras de colágeno em ambas as estruturas. Resultados semelhantes foram observados em coelho por Traish *et al*<sup>22</sup>, que encontrou uma redução do músculo liso trabecular, reversível por reposição hormonal. Neste trabalho, foi realizado uma castração do coelho e feito acompanhamento por apenas 1 semana, quando então era realizada a reposição hormonal. Uma semana após o animal era sacrificado e o tecido peniano analisado. A conclusão foi que as alterações penianas causadas pela castração eram totalmente reversíveis pela reposição hormonal. Porém não sabemos se essa reversão acontece em animais submetidos à supressão hormonal de longa duração.

O presente trabalho tem como objetivo verificar, através de métodos quantitativos, que apresentem um mínimo de viés, o papel da reposição hormonal tardia como meio de reverter as alterações estruturais do corpo cavernoso de ratos.

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

O uso dos animais foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da universidade estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

Serão utilizados 25 ratos Sprague-Dawley machos, com idade aproximada de 12 semanas. Os animais foram divididos em 5 grupos com 5 animais em cada grupo e tratados segundo o esquema abaixo.



### 1.1 Procedimento Cirúrgico

Todos os grupos foram submetidos à anestesia intraperitoneal com 60 a 80mg de cetamina + 8 a 15mg de xilazina, ambas /kg.

A bolsa escrotal foi aberta na linha mediana até a exposição dos testículos. Os grupos orquiectomizados tiveram os testículos retirados após prévia ligadura do cordão espermático com fio de algodão 3-0 (**Foto 1**). O grupo simulado sofreu a mesma manipulação dos testículos, porém sem a sua

retirada. No final do experimento todos os grupos tiveram a bolsa escrotal fechada com pontos simples de nylon 4-0.

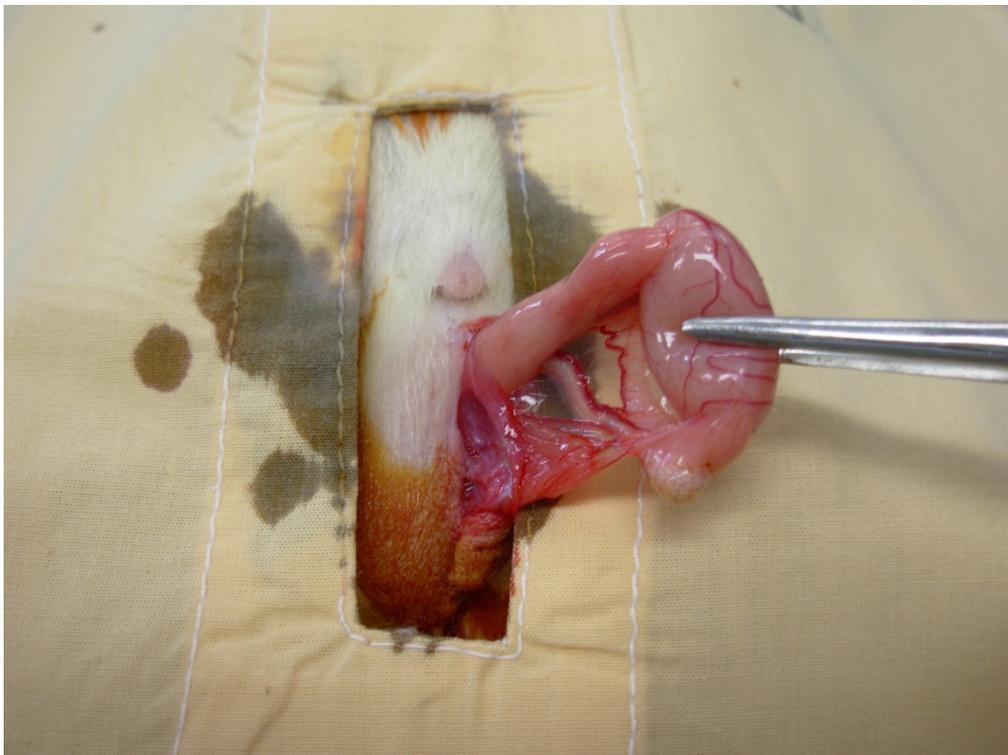


Foto 1- Exteriorização testicular

### 1.2 Suplementação com testosterona

A suplementação com undecanoato de testosterona foi realizada somente no grupo (T) no primeiro dia do segundo mês na dose de 100mg/kg subcutânea, dose única<sup>23</sup>.

### 1.3 Obtenção do material

Os animais foram sedados com éter sulfúrico e mortos por deslocamento cervical. O sangue foi retirado, por punção intracardíaca do átrio direito e

imediatamente posto no gelo, centrifugado a 4°C, 3000 rpm por 30 min. O plasma foi então separado e estocado a - 80°C, para análise por radioimunoensáio dos níveis de testosterona séricos.

O pênis foi dissecado e retirado em bloco, sem pele (foto 2). O corpo peniano, antes da curvatura de 90°, foi separado da glande. O corpo peniano foi retirado e fixado em formalina tamponada 10% (pH 7.2) sendo posteriormente processado para inclusão em parafina.

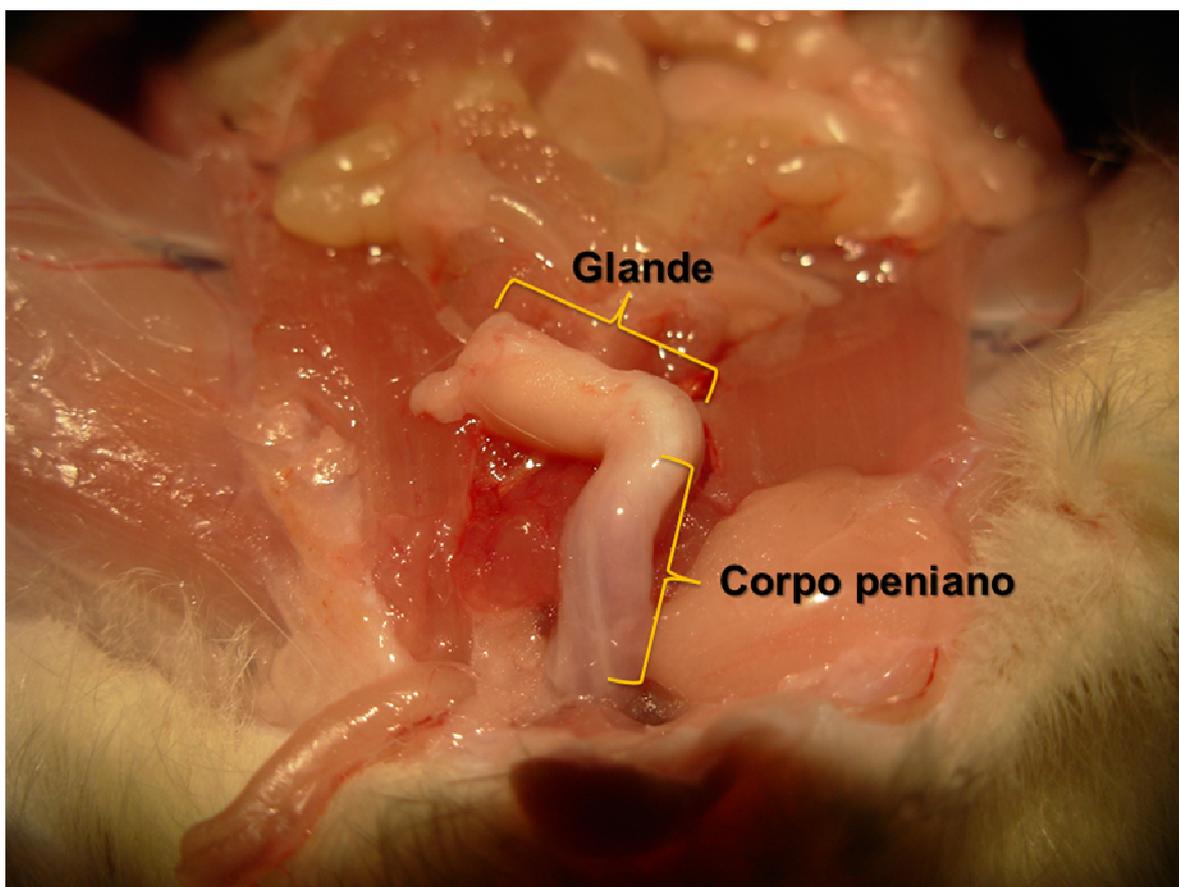


Foto 6- Dissecção peniana (glande e corpo peniano)

#### 2.4 Histoquímica e imunohistoquímica

Foram empregadas as seguintes técnicas de coloração e marcação para evidenciar as estruturas estudadas: Hematoxilina-Eosina, para observação da

integridade do material. Picrus Sirius Red, observado sob luz polarizada para a quantificação do colágeno e delimitação do espaço sinusoidal. *Imunohistoquímica: anti-alfa-actina*, para a caracterização e quantificação das fibras musculares lisas.

## 1.5 Análise do material

### 1.5.1 Colágeno

O método de coloração pelo Sirius Red permite que os radicais sulfônicos do corante reajam com os grupamentos amínicos da lisina, um dos principais aminoácidos que compõe o colágeno, intensificando sua birrefringência<sup>24</sup>. Quando observado sob luz polarizada, o colágeno apresenta birrefringência com diferentes tons entre o vermelho, amarelo e verde, sobre um fundo negro<sup>25</sup>.

De cada animal foram realizados seis cortes transversais do pênis, de forma não seqüencial, num total de cinco animais por grupo. Procedeu-se a aquisição digital utilizando-se um microscópio Olympus BX51 e câmara digital DP70 com magnificação final de 40 X sob luz polarizada. A resolução foi de 4080 x 3072 (300 pixel/ inch). Os cortes maiores que o campo microscópico de 40 X foram adquiridas em 2 tempos e reunidas digitalmente (Figura1) . Ao final do processo de montagem das imagens, todas elas foram colocadas num fundo único do mesmo tamanho (4080x4000), bem como as imagens que não necessitaram montagem (Figura1). Desta forma todos os cortes tinham a mesma resolução e tamanho de imagem, respeitando-se as proporcionalidades.

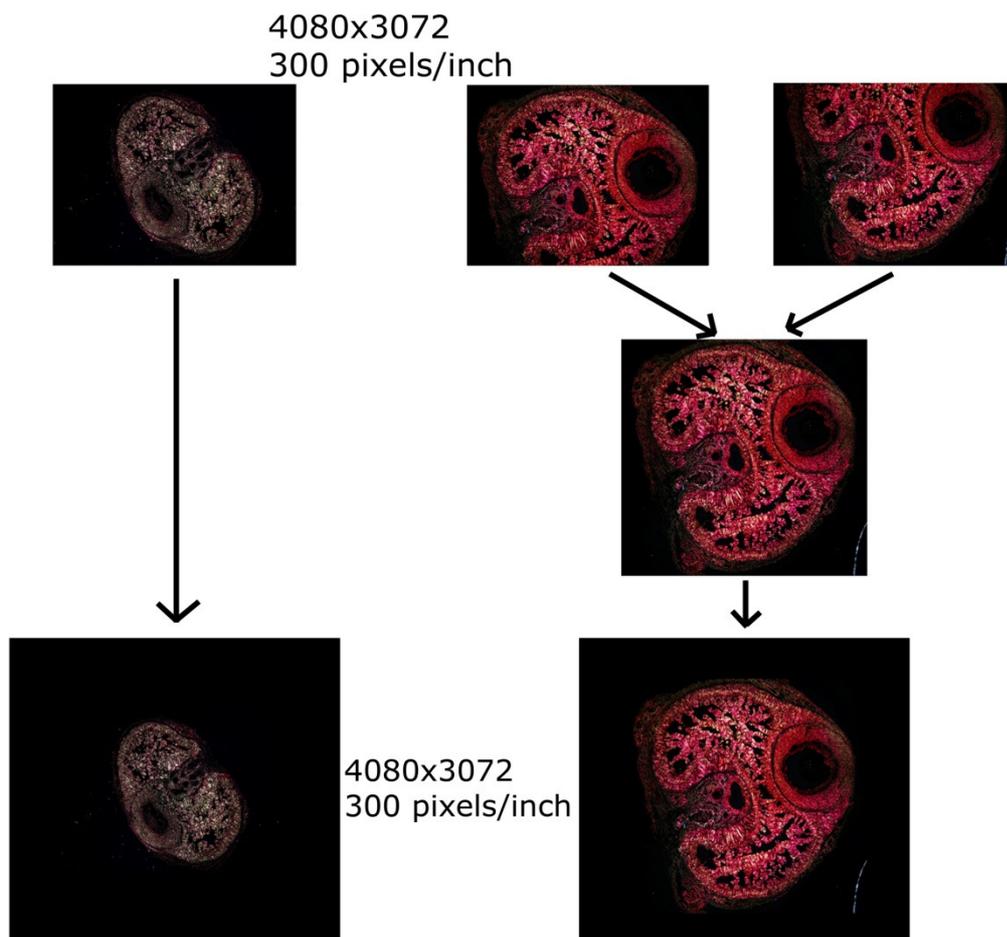


Figura 1 – Montagem das imagens



Figura 2- Dissecção digital. A parte vermelha da seleção será apagada, restando apenas o corpo cavernoso.



Figura 3- Corpo cavernoso dissecado, aspecto final.

Com as imagens padronizadas inicia-se a dissecção digital da túnica albugínea, que é totalmente apagada, restando apenas o tecido eretor (figura 2 e 3).

A etapa seguinte foi o transporte dessas imagens para o programa Image-Pró plus versão 4.5.0.29. Utilizando-se uma ferramenta de seleção de cor, procedeu-se a seleção de toda a cor preta retirando da imagem tudo o que não era colágeno (Figura 4). O próximo passo foi a confecção de uma máscara onde o que era colágeno ficava de cor preta e o que não era de cor branca (Figura 5). Utilizando a ferramenta de histograma foi aferido o percentual da imagem que era preto, isto é: o colágeno (Figura 6).

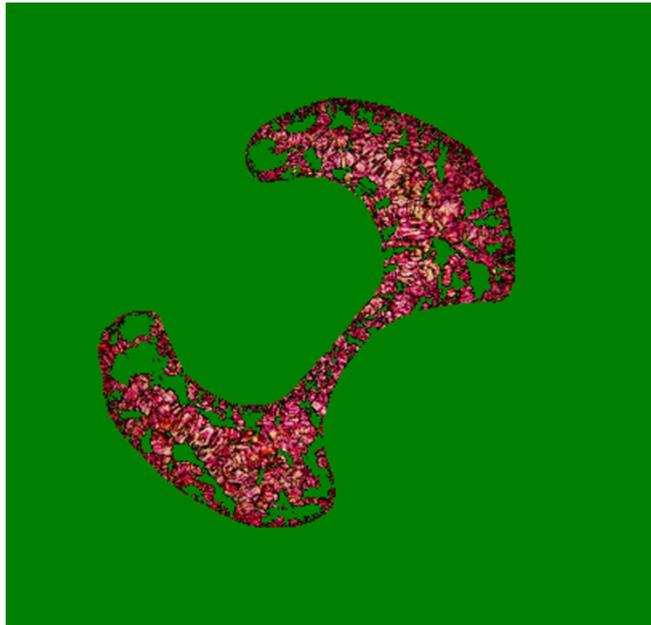


Figura 4- Seleção da área preta, agora em verde. O colágeno aparece em tons avermelhados.



Figura 5- Aspecto da máscara. Em preto = colágeno.

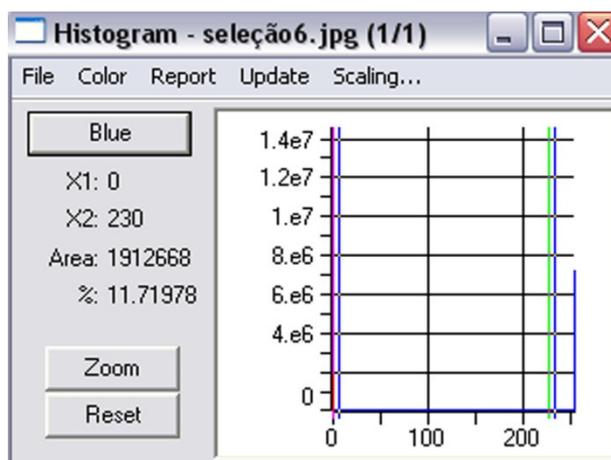


Figura 6- Histograma mostrando o total de pontos em preto (Área) e a porcentagem que o preto representa na imagem (tamanho padronizado)

### 1.5.2 Espaço sinusoidal

Utilizando-se as imagens previamente adquiridas e tratadas para a aferição do colágeno, procedeu-se a um outro tratamento digital, onde a porção externa ao tecido eretor torna-se totalmente branca (Figura 7). Leva-se mais uma vez essa imagem para o Image-pró e procede-se a análise do percentual que aparece de cor preta (espaço sinusoidal) na imagem, de acordo com os passos previamente descritos (Figura 8).



Figura 7- Nova manipulação digital para aferir o espaço sinusoidal.



Figura 8- Seleção do espaço sinusoidal (verde)

### 1.5.3 Músculo liso

Foi realizada a seleção do músculo liso após aquisição digital dos cortes histológicos do tecido peniano, obtida com a mesma resolução das imagens anteriores. A imunomarcação evidenciou o músculo liso em marrom (Figuras 9,10,11).

Feita a seleção, foi gerada uma máscara baseada nessas delimitações (Figura 12), ficando na cor branca o que era músculo liso em preto todo o resto. O Image – pró, utilizando a ferramenta de histograma, procedeu a análise do percentual, seguindo os passos previamente descritos.

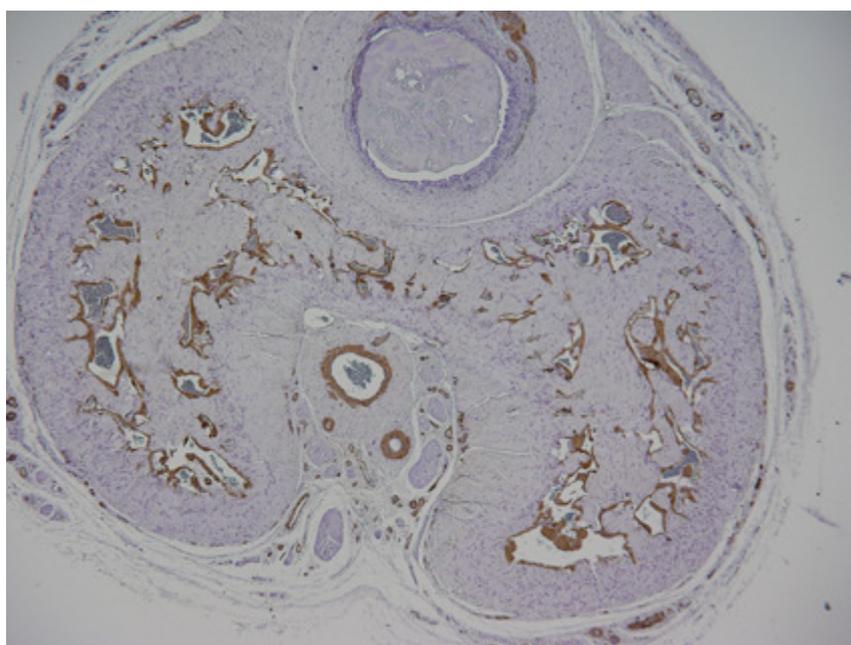


Figura 9 – Aquisição digital do corte transverso do pênis com imunomarcação (Antiaflectina) para músculo liso



Figura 10- Exclusão do tecido fora do corpo cavernoso

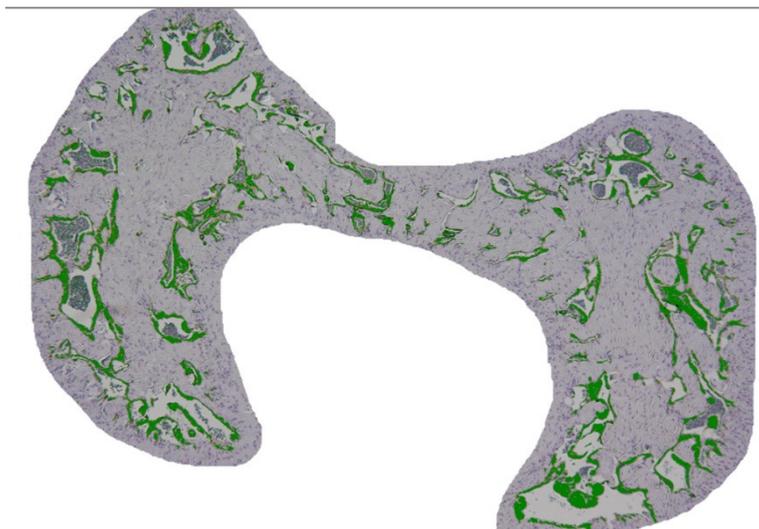


Figura 11- Marcação digital do músculo liso, por similaridade de cor.

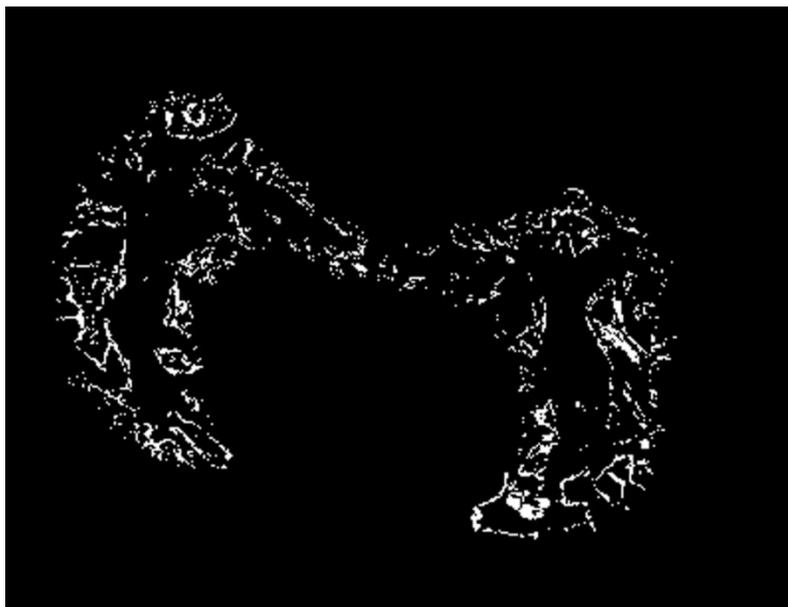


Figura 12- Máscara final. Em branco o músculo liso

#### 1.5.4- Área total do corpo cavernoso

Ao final da dissecção digital, foi feita a seleção da área do corpo cavernoso sendo convertida para cor preta (Figura 13).

Utilizando a ferramenta de histograma do Image-pró, foi aferido o percentual da imagem em preto, isto é, a área da secção transversa.



Figura 13- Em preto a área total do corpo cavernoso

### 1.5.5- Densidade

Foi chamado de densidade, de um determinado componente estrutural analisado, a divisão entre o resultado da estrutura e a área total da secção do corpo cavernoso.

Um exemplo seria a divisão entre o resultado do colágeno e a área do corpo cavernoso de um determinado corte. (Figura 14)

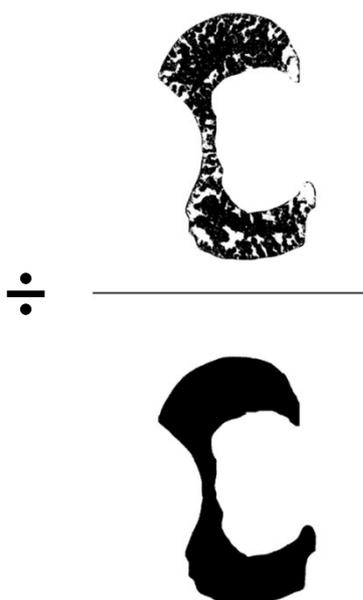


Figura 14- Densidade: Divisão entre o que foi marcado e a área total

### 1.6 **Análise estatística**

Na avaliação entre os dois grupos sacrificados no primeiro mês foi utilizado T test, para a comparação entre as médias.

Nos 3 grupos sacrificados após dois meses foi utilizado ANOVA com pós teste de Bonferroni, para avaliação entre os grupos.

## 2 RESULTADOS

Os valores séricos da testosterona demonstraram que a orquiectomia foi efetiva, com ausência de testosterona circulante nos grupos castrados, tanto nos sacrificados com 1 mês, quanto nos de 2 meses (Figura 15 e 16). A reposição hormonal se mostrou eficiente, com recuperação dos níveis séricos da testosterona a valores similares ao grupo controle (Figura 15).

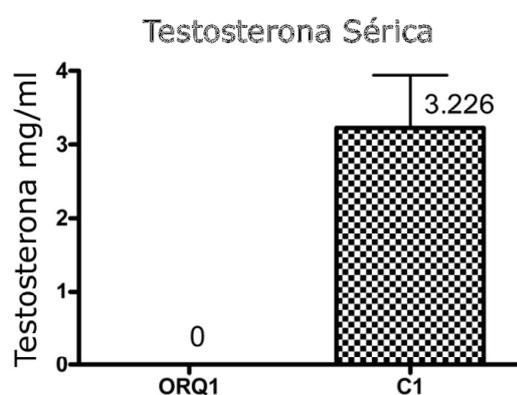


Figura 15- Níveis de testosterona sérica (mg/ml) nos grupos ORQ1 e C1 ( $p=0,0005$ ).

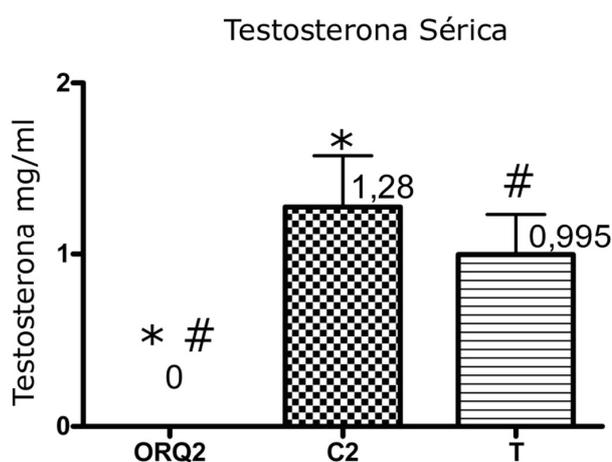
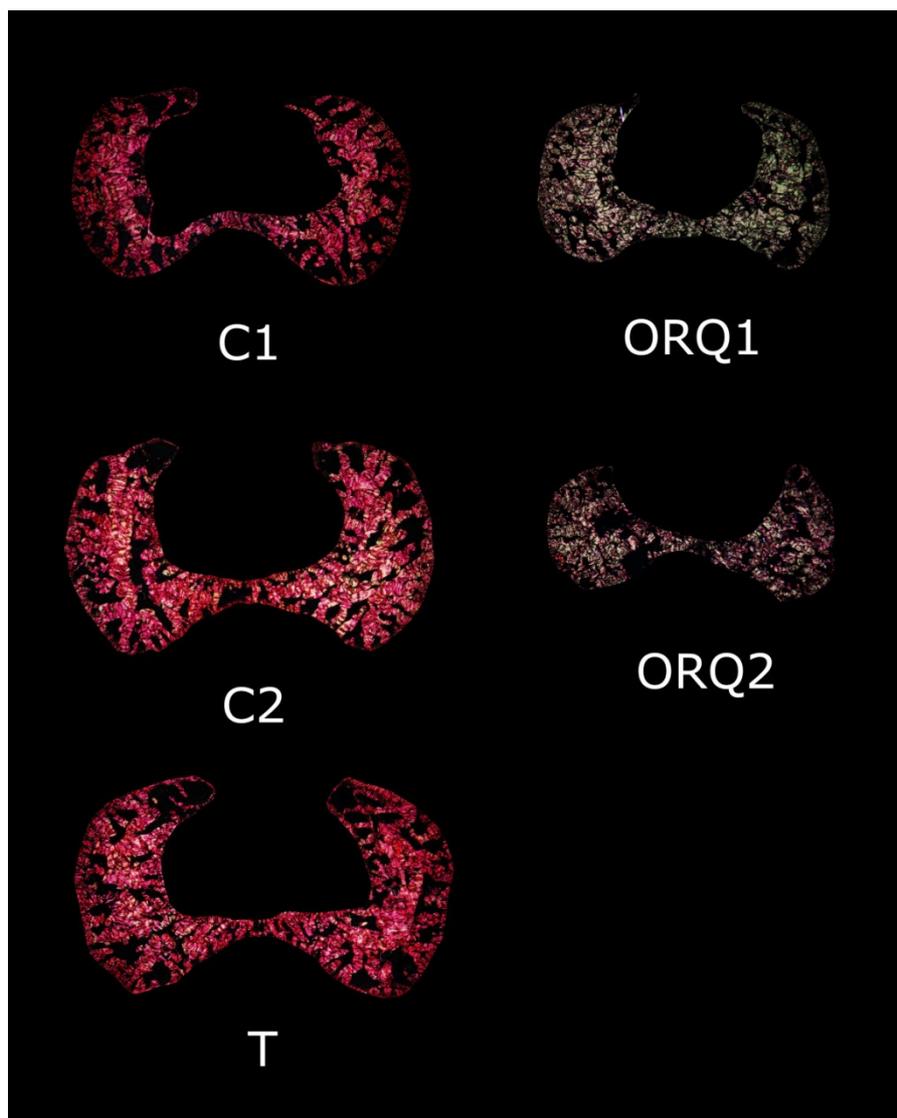


Figura 16- Níveis de testosterona sérica (mg/ml) nos grupos ORQ2, C2 e T. ANOVA  $P=0,0013$  / ORQ2 vs C2  $P < 0,01$  \* / ORQ2 vs T  $P < 0,05$  #

Os resultados mostram uma redução significativa entre os grupos analisados em valores absolutos no que se refere ao colágeno, músculo liso e espaço sinusoidal e área total do corpo cavernoso após dois meses. Em relação a *densidade* não foram observadas alterações significativas. A reposição com testosterona mostrou um aumento de todos estes elementos.

Os resultados encontram-se nas tabelas 1-2-3-4 e na Figura 17



**Figura 17-** Corpo cavernoso após dissecação digital nos diferentes grupos. Picosirius red sob luz polarizada (x40). **ORQ1** = Grupo submetido à orquiectomia e sacrificado após 1 mês. **C1**- Grupo controle morto após 1 mês. **ORQ2** - Grupo orquiectomizado e morto após 2 meses. **C2** - Grupo controle morto após 2 meses. **T** – Grupo orquiectomizado que recebeu, após 1 mês, suplementação com undecanoato de testosterona na dose de 100mg/ Kg subcutâneo. Após 1 mês de reposição hormonal os animais foram mortos.

**TABELA 1**

**DENSIDADES em % dos diferentes elementos analisados do corpo cavernoso do pênis de ratos.**

	Colágeno	Músculo Liso	Sinusóide
ORQ1	63,67 ± 1,5*	8,75 ± 2,0	27 ± 4,5
C1	59,59 ± 3,079*	8,91 ± 1,6	30,76 ± 3,26
T Test (P)	0,0288	0,9078	0,1714

ORQ1 – Grupo orquiectomizado sacrificado após 1 mês. C1- Grupo controle sacrificado após 1 mês.

**TABELA 2**

**DENSIDADES em % do corpo cavernoso (grupos sacrificados após 02 mês)**

	Colágeno	Músculo Liso	Sinusóide
ORQ2	65,41 ± 4,8	6,2 ± 1,4	26,75 ± 4,8
C2	59,91 ± 6,97	8,59 ± 2,5	31,58 ± 4,7
T	62,72 ± 0,99	7,22 ± 1,6	30,53 ± 1,7
ANOVA (P)	0,2508	0,2098	0,1823

ORQ2 – Grupo orquiectomizado sacrificado após 2 mês. C1- Grupo controle sacrificado após 2 mês. T- Grupo orquiectomizado que recebeu suplementação de testosterona após 1 mês e sacrificado no fim do segundo mês.

**TABELA 3****Valores absolutos. Média do % em relação à imagem.**

	Colágeno	Músculo liso	Sinusóide	Área do corpo cavernoso
ORQ1	8,5 ± 1,5	1,177 ± 2,03	3,677 ± 4,56	13,37 ± 2,1*
C1	10,0 ± 3,08	1,446 ± 1,60	5,164 ± 3,26	16,81 ± 1,5*
T test (P)	0,0642	0,1505	0,0524	0,0178*

ORQ1 – Grupo orquiectomizado sacrificado após 1 mês. C1- Grupo controle sacrificado após 1 mês.

**TABELA 4****Valores absolutos. Média do % em relação à imagem.**

	Colágeno	Músculo liso	Sinusóide	Área do corpo cavernoso
ORQ2	9,01 ± 4,83*	0,83 ± 1,43*#	3,6 ± 4,86*#	13,89 ± 2,12*#
C2	10,69 ± 6,98	1,51 ± 2,54*	5,58 ± 4,75*	17,75 ± 1,75*
T	12,41 ± 0,1*	1,44 ± 1,61#	6,03 ± 1,74#	19,77 ± 0,76#
ANOVA (P)	0,0087	0,0044	0,0004	0,0004
<b>Pós test</b>	ORQ2 vs T p<0,05	ORQ2 vs C2 P<0,01* ORQ2 vs T P<0,05#	ORQ2 vs C2 P<0,01* ORQ2 vs T P<0,001#	ORQ2 vs C2 P<0,01* ORQ2 vs T P<0,001#

ORQ2 – Grupo orquiectomizado sacrificado após 2 mês. C1- Grupo controle sacrificado após 2 mês. T- Grupo orquiectomizado que recebeu suplementação de testosterona após 1 mês e sacrificado no fim do segundo mês.

### 3 DISCUSSÃO

O envelhecimento da população e a busca por uma qualidade de vida satisfatória têm estimulado a procura por soluções capazes de diminuir as alterações decorrentes da idade. Dentre as alterações masculinas podemos destacar a deficiência androgênica com disfunção sexual erétil.

A manutenção de uma vida sexual ativa depende muito do trofismo das estruturas penianas eréteis, que sofrem alterações com a queda do nível sérico da testosterona<sup>21,26,27</sup>. A análise desses níveis permitiu testar a hipótese de que existem modificações no corpo cavernoso causadas pela variação sérica de testosterona, como se pode ver na Figura 4 e 5.

A questão é saber se as estruturas penianas estão cronicamente e definitivamente afetadas pela carência hormonal. O trabalho tentou portanto simular, em modelo animal, o que ocorre na prática clínica, que é a carência de testosterona por período prolongado de tempo, pois o paciente hipogonádico geralmente é identificado tardiamente. Sendo assim analisamos no corpo cavernoso as alterações estruturais tardias da castração (até dois meses) e a reposição de testosterona feita após um mês de castração.

Diversos autores observaram o efeito da castração nas estruturas penianas, na fisiologia do corpo cavernoso e o efeito da reposição hormonal no pênis de animais castrados<sup>22,26,28,29</sup>. Uma aparente discrepância entre estes trabalhos e os resultados aqui obtidos se deve ao fato de que os autores não levaram em consideração o valor absoluto, apenas a densidade, onde a diminuição da área total do pênis influencia os valores finais. Além disso nesses trabalhos as observações foram feitas após um período curto de tempo.

O aumento da densidade do colágeno do grupo orquiectomizado (ORQ1) em relação ao controle (C1) é apenas um aumento aparente. O valor final da densidade é baseado na divisão entre a área do colágeno e a área total da secção transversa do corpo cavernoso. Ambos sofrem redução com a orquiectomia, sendo que secção transversa tem uma redução maior (21%) do que o colágeno (15%) fazendo com que o valor da densidade aumente.

Avaliando a densidade do colágeno nos grupos sacrificados após dois meses de orquiectomia não foram observadas diferenças significativas entre eles, pois a variação do colágeno acompanhou a variação da área da secção transversa do corpo cavernoso, mantendo proporções semelhantes (colágeno/área) entre os grupos (Tabela 2). Porém a observação dos valores absolutos mostrou que os animais castrados com reposição de testosterona (T) apresentaram um aumento significativo da quantidade de colágeno em relação ao grupo orquiectomizado (ORQ2). Quando esses dois grupos são comparados ao controle (C2) não existem diferenças significativas. Portanto a castração provoca uma pequena redução do colágeno e a reposição um pequeno aumento (Tabela 4).

O músculo liso apresentou redução dos seus valores absolutos somente no segundo mês após a orquiectomia (Tab 3). Neste grupo de dois meses essa diferença apareceu de forma significativa, mostrando uma redução de aproximadamente 45% no grupo orquiectomizado quando comparado ao controle. O grupo com reposição de testosterona apresentou valores semelhantes ao controle, mostrando que a reposição hormonal foi efetiva em reverter o processo de redução da quantidade de músculo liso (Tab 4).

A densidade do espaço sinusoidal não sofreu alteração significativa, seja em um mês ou em dois meses (Tabs 1 e 2), pois de forma semelhante ao que ocorre com o colágeno a variação da área da secção transversa do corpo cavernoso acompanhou a variação do espaço sinusoidal. Na análise dos valores absolutos do espaço sinusoidal de grupos mortos com dois meses foram observadas diferenças significativas. O grupo orquiectomizado (ORQ2) apresentou uma redução de aproximadamente 35,5% da área total do espaço sinusoidal em relação ao grupo controle (C2) e o grupo com reposição hormonal (T) mostrou valores similares ao controle (Tab 4). Neste caso a reposição hormonal também foi efetiva na restauração do espaço sinusoidal a valores semelhantes ao do grupo controle (C2).

A análise do espaço sinusoidal sugere duas hipóteses que justificam a disfunção sexual erétil dos indivíduos hipogonádicos. Na primeira delas podemos supor que a redução do espaço sinusoidal é conseqüência da redução da pressão intracavernosa, secundária ao escape venoso presente na carência de testosterona. O enchimento dos sinusóides ficaria prejudicado pela

baixa distensão das suas paredes, conseqüência da baixa pressão sanguínea intracavernosa. Na segunda hipótese temos a redução dos sinusóides como fator primário, conseqüência de uma baixa complacência de suas paredes. Em ambos os casos os sinusóides não comprimem as veias circunflexas profundas contra a túnica albugínea, resultando no escape venoso e baixa pressão intracavernosa<sup>28</sup>.

Na orquiectomia ocorre uma redução do colágeno, músculo liso e espaço sinusoidal. Isto traz como conseqüência a redução da área da secção transversa do corpo cavernoso (Figura 6). A redução foi relativamente pequena no primeiro mês e bem maior no segundo mês, mantendo a proporção entre os diferentes elementos. Após a reposição hormonal, as alterações conseqüentes à orquiectomia recuperaram níveis semelhantes ao controle. A metodologia utilizada permitiu mostrar que valores absolutos demonstram melhor o que de fato ocorre com os elementos observados, eliminando um viés de análise, quando se consideram os valores relativos. Esses resultados sugerem que a reposição, mesmo quando realizada tardiamente, foi eficaz na reversibilidade das alterações geradas pela castração.

## REFERÊNCIAS

1. Lunenfeld, B.: Androgen therapy in the aging male. *World J Urol*, **21**: 292, 2003
2. Araujo, A. B., O'Donnell, A. B., Brambilla, D. J. et al.: Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men: estimates from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**: 5920, 2004
3. Bancroft, J.: Hormones and human sexual behavior. *J Sex Marital Ther*, **10**: 3, 1984
4. Bancroft, J., Wu, F. C.: Changes in erectile responsiveness during androgen replacement therapy. *Arch Sex Behav*, **12**: 59, 1983
5. Carani, C., Granata, A. R., Bancroft, J. et al.: The effects of testosterone replacement on nocturnal penile tumescence and rigidity and erectile response to visual erotic stimuli in hypogonadal men. *Psychoneuroendocrinology*, **20**: 743, 1995
6. Granata AR, R. V., Lerch A, Marrama P, Carani C: Relationship between sleep-related erections and testosterone levels in men. *J Androl*, **18**: 522, 1997
7. Bhasin, S., Woodhouse, L., Casaburi, R. et al.: Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**: E1172, 2001
8. Buena, F., Swerdloff, R. S., Steiner, B. S. et al.: Sexual function does not change when serum testosterone levels are pharmacologically varied within the normal male range. *Fertil Steril*, **59**: 1118, 1993
9. Gooren, L. J.: Androgen levels and sex functions in testosterone-treated hypogonadal men. *Arch Sex Behav*, **16**: 463, 1987
10. Salmimies, P., Kockott, G., Pirke, K. M. et al.: Effects of testosterone replacement on sexual behavior in hypogonadal men. *Arch Sex Behav*, **11**: 345, 1982
11. Schiavi, R. C., Rehman, J.: Sexuality and aging. *Urol Clin North Am*, **22**: 711, 1995
12. Gray, P. B., Singh, A. B., Woodhouse, L. J. et al.: Dose-dependent effects of testosterone on sexual function, mood, and visuospatial cognition in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**: 3838, 2005
13. Huang, X. B., Xiong, C. L., Yu, C. G. et al.: Effect of sildenafil citrate on

- penile erection of rhesus macaques. *Asian J Androl*, **6**: 233, 2004
14. Park, J. Y., Son, H., Kim, S. W. et al.: Potentiation of apomorphine effect on sildenafil-induced penile erection in conscious rabbits. *Asian J Androl*, **6**: 205, 2004
15. de Tejada, I. S.: Therapeutic strategies for optimizing PDE-5 inhibitor therapy in patients with erectile dysfunction considered difficult or challenging to treat. *Int J Impot Res*, **16 Suppl 1**: S40, 2004
16. Park, K., Ku, J. H., Kim, S. W. et al.: Risk factors in predicting a poor response to sildenafil citrate in elderly men with erectile dysfunction. *BJU Int*, **95**: 366, 2005
17. Nieschlag, E., Swerdloff, R., Behre, H. M. et al.: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *Eur Urol*, **48**: 1, 2005
18. Andersson, K. E., Wagner, G.: Physiology of penile erection. *Physiol Rev*, **75**: 191, 1995
19. Udelson, D., Nehra, A., Hatzichristou, D. G. et al.: Engineering analysis of penile hemodynamic and structural-dynamic relationships: Part I--Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int J Impot Res*, **10**: 15, 1998
20. Moreland, R. B.: Is there a role of hypoxemia in penile fibrosis: a viewpoint presented to the Society for the Study of Impotence. *Int J Impot Res*, **10**: 113, 1998
21. Shen, Z. J., Zhou, X. L., Lu, Y. L. et al.: Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian J Androl*, **5**: 33, 2003
22. Traish, A. M., Park, K., Dhir, V. et al.: Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology*, **140**: 1861, 1999
23. Callies, F., Kollenkirchen, U., von zur Muhlen, C. et al.: Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **111**: 203, 2003
24. Montes, G. S., Cotta-Pereira, G; Junqueira, L.C.U.: The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. *Advance in Cellular Neurobiology*, **5**: 177 1984
25. Junqueira, L. C., Carneiro, J.: *Histologia Básica*, 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999

26. Alcorn, J. F., Toepfer, J. R., Leipheimer, R. E.: The effects of castration on relaxation of rat corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J Urol*, **161**: 686, 1999
27. Gooren, L. J., Saad, F.: Recent insights into androgen action on the anatomical and physiological substrate of penile erection. *Asian J Androl*, **8**: 3, 2006
28. Dai, Y. T., Stopper, V., Lewis, R. et al.: Effects of castration and testosterone replacement on veno-occlusion during penile erection in the rat. *Asian J Androl*, **1**: 53, 1999
29. Mills, T. M., Wiedmeier, V. T., Stopper, V. S.: Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod*, **46**: 342, 1992
30. Morales, A., Lunenfeld, B.: Investigation, treatment and monitoring of late onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. *Aging Male*, **5**: 74, 2002
31. Morley, J. E., Perry, H. M., 3rd: Androgen deficiency in aging men. *Med Clin North Am*, **83**: 1279, 1999
32. Heaton, J. P., Varrin, S. J.: Effects of castration and exogenous testosterone supplementation in an animal model of penile erection. *J Urol*, **151**: 797, 1994
33. Li Z, W., Y. X., Zheng, S., Xiang, Z. Q. et al.: The effects of testosterone undecanoate on relaxation of rat corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue*, **8**: 130, 2002
34. Mills, T. M., Reilly, C. M., Lewis, R. W.: Androgens and penile erection: a review. *J Androl*, **17**: 633, 1996
35. Nehra, A., Azadzo, K. M., Moreland, R. B. et al.: Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. *J Urol*, **159**: 2229, 1998
36. Traish, A. M., Guay, A. T.: Are androgens critical for penile erections in humans? Examining the clinical and preclinical evidence. *J Sex Med*, **3**: 382, 2006

**APÊNDICE** - Effects of Castration and Late Hormonal Replacement in the Structure of Rat Corpora Cavernosa

Artigo referente ao assunto do presente trabalho de mestrado, que foi submetido para publicação no **The journal of sexual medicine**.

The Journal of Sexual Medicine. - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://jsm.issir.org/> Ir Links

THE JOURNAL OF  
**Sexual  
Medicine**

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | [Get Help Now](#)



Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation

You are logged in as Francisco Sampaio

### Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Sexual Medicine*.

Manuscript ID:	JSM-03-2009-172
Title:	Effects of Castration and Late Hormonal Replacement in the Structure of Rat Corpora Cavernosa
Authors:	Miranda, Alexandre Costa, Waldemar Sampaio, Francisco
Date Submitted:	08-Mar-2009

 Print  Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.1.2 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.  
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.  
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

THE JOURNAL OF  
**Sexual  
Medicine**

**Effects of Castration and Late Hormonal Replacement in the  
Structure of Rat Corpora Cavernosa**

Journal:	<i>Journal of Sexual Medicine</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Research
Keywords:	penis, corpora cavernosa, testosterone, andropause, rat, smooth muscle
Subject Area:	Anatomy (gross and microscopic) < BASIC SCIENCE < BOTH GENDERS, Animal models < BASIC SCIENCE < BOTH GENDERS, Endocrinologic studies of sexual function < BASIC SCIENCE < BOTH GENDERS

 scholarONE™  
Manuscript Central

## **Effects of Castration and Late Hormonal Replacement in the Structure of Rat Corpora Cavernosa**

Short title: Effects of Androgen Deprivation in Erectile Tissue of Rats

**Alexandre de Freitas Miranda, Waldemar S. Costa, Francisco J. B.  
Sampaio**

Urogenital Basic and Translational Research Unit, State University of Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

## ABSTRACT

**Introduction.** Studies in animals and humans have suggested that adequate levels of testosterone are necessary to preserve the integrity of penile erectile tissue. No previously reported studies have confirmed if these structural changes are reversible following long-term hormonal deprivation.

**Aim.** To evaluate, through quantitative methods, the structural alterations in the corpora cavernosa of rats submitted to surgical castration as well as the role of late hormone replacement in reversing the possible structural alterations.

**Methods.** We used 25 male Sprague-Dawley rats who were approximately 12 weeks of age. The animals were divided into 5 groups composed of 5 animals each and treated as follows. ORCHIEC-1 = group that underwent orchiectomy and were sacrificed after 1 month, C-1 = control group sacrificed after 1 month, ORCHIEC-2 = group that underwent orchiectomy and were sacrificed after 2 months, C-2 = control group sacrificed after 2 months, T = group that underwent orchiectomy, and after 1 month underwent testosterone replacement with a subcutaneous single dose of testosterone undecanoate at 100 mg/kg (T); after 1 month of hormonal replacement, the animals were sacrificed.

**Main Outcome Measures.** Quantification of smooth muscle, collagen and elastic system fibers in controls and rats submitted to orchiectomy alone and with late hormonal replacement.

**Results.** There were a significant decrease in the absolute values of collagen, smooth muscle, sinusoidal space and total area of corpora cavernosa after 2 months in the castrated group when compared with controls. Overall, as regards density, no significant differences were observed among the groups.

The hormonal replacement with testosterone was able to reverse the alterations observed, demonstrating an increase in the elements studied.

**Conclusions.** The method used for this research allowed demonstrating that absolute values are reliable to quantify the structural alterations of corpora cavernosa structures. The results suggest that hormonal replacement, even when instituted at a late stage, is effective in reversing the corpora cavernosa alterations produced by castration.

**Key words:** penis, testosterone, andropause, collagen, smooth muscle, rat

## INTRODUCTION

Testosterone has been considered essential for maintenance of sexual function (1,2). Adequate serum levels of testosterone are important not only for maintenance of erectile function, but also for cognitive processes and body mass composition. When low levels of testosterone are found in aging male, the condition is called andropause or androgen deficiency of the aging male (ADAM) (<sup>30,31</sup>). In male aging, 6% of men with 40 years-old and 12% with 69 years-old will present ADAM (<sup>2</sup>). Hormonal replacement has been proposed to restore the secondary alterations of hypogonadism, including sexual function (<sup>30,31</sup>).

In recent years, testosterone decrease related to aging has received especial attention; nevertheless, its pathophysiological significance, in particular, continues to remain controversial (6). Studies in animals and humans have suggested that adequate levels of testosterone are necessary to preserve the integrity of penile erectile tissue. Moreover, testosterone is important for the biochemical mechanisms involved in erection, as well as being linked to erectile dysfunction (<sup>1,2,5-7,9,10,12,18,21,22,26-29,32-36</sup>). Shen et al. (<sup>21</sup>) reported that androgen deprivation caused a decrease of elastic fibers in tunica albuginea and smooth muscle in corpora cavernosa of rats, both replaced by irregularly arranged collagenous fibers. Similar findings were reported in rabbits by Traish et al. (<sup>22</sup>), who found a decrease in the trabecular smooth muscle, an alteration that was reversible with hormonal replacement. However, these experiments were performed using short-term hormone deprivation. To our knowledge, no previously reported studies have confirmed if these structural changes are reversible following long-term hormonal deprivation.

Our objective was to evaluate, through quantitative methods, the structural alterations in the corpora cavernosa of rats submitted to surgical castration as well as the role of late hormone replacement in reversing the possible structural alterations.

## **MATERIALS AND METHODS**

The Animal Care and Use Committee of the State University of Rio de Janeiro approved the handling of the animals and the study design was approved by the local Ethical Committee for the care and use of laboratory animals.

### Experimental Model

We used 25 male Sprague-Dawley rats who were approximately 12 weeks of age. The animals were divided into 5 groups composed of 5 animals each and treated as follows. ORCHIEC-1 = group that underwent orchiectomy and were sacrificed after 1 month, C-1 = control group sacrificed after 1 month, ORCHIEC-2 = group that underwent orchiectomy and were sacrificed after 2 months, C-2 = control group sacrificed after 2 months, T = group that underwent orchiectomy, and after 1 month underwent testosterone replacement with a subcutaneous single dose of testosterone undecanoate at 100 mg/kg (T); after 1 month of hormonal replacement, the animals were sacrificed.

All animals underwent intraperitoneal general anesthesia with 60 to 80 mg/kg of ketamine associated with 8 to 15 mg/kg of xylazine. The scrotum was incised at the midline and the testes were exposed. In the orchiectomy groups, the testes were removed after en bloc ligation of the spermatic cord, and in the control groups, the testis were exposed, manipulated and reinserted into the scrotum. Group-T underwent testosterone replacement after 30 days of orchiectomy with a subcutaneous single dose of testosterone undecanoate (100 mg/kg) (25).

At the end of each experiment, the animals were anesthetized with ether, and testosterone serum concentrations were determined using a specific radioimmunoassay (ICN Pharmaceuticals, Inc, CA, USA). The animals were sacrificed by cervical fracture and the penis was withdrawn en bloc without the

skin. The distal region of the penis (glans), located distally to the 90-degree penile angle of the rat, was discharged. The proximal fragment was fixed in 10% buffer formalin (pH 7.2) for 24 hours and then routinely processed for paraffin-embedding. From each penis, we obtained 6 transversal sections of 5- $\mu$ m thick. All samples were initially stained with Hematoxylin-Eosin and analyzed for tissue integrity.

### Histochemistry and Immunohistochemistry

Picrosirius red stain was used to analyze and quantify collagen and sinusoids. The Picrosirius method enables sulfonic radicals in the dye to react with the amine groups of lysine, which is one the major amino acid components of collagen, thus, intensifying its birefringence. When observed under polarization, the collagen presents birefringence with varying colors, as tonalities of red, yellow and green over a black background.

An anti-mouse smooth muscle alpha-actin antibody (Zymed<sup>®</sup> Laboratories - invitrogen immunodetection) and a secondary antibody Histostain<sup>®</sup> –Plus Kits (Zymed<sup>®</sup> Laboratories - invitrogen immunodetection) were used for characterization and quantification of smooth muscle fibers.

### Quantitative Analysis

The Picrosirius red images observed under polarization were photographed with a digital camera DP70 coupled to an Olympus BX51 microscope with a X40 magnification and a resolution of 4080 x 3072 (300 pixel/inch). Some images of the sections were greater than the microscope field and therefore were obtained in 2 stages and then digitally united (Figure 1). At the end of the image processing, they were placed on a background of the same size (4080x4000), and in this way, all sections remained at the same magnification and resolution, with the proportions maintained.

After image standardization, we proceed with a digital dissection of the tunica albuginea, which was completely deleted, leaving only the erectile tissue. The images were transferred to the Image-Pro plus software by using the same color-selecting tool. All black color in the image was selected, and only the stained tissue remained, i.e. everything that was not collagen was removed. The next step was the confection of a mask, where the collagen become black and the rest become white. By using the histogram tool, we estimated the percentage of black in the image, thus quantifying the collagen (Figure 2).

By using the images obtained previously for collagen quantification, we performed another digital treatment on which the region outside of the erectile tissue was placed completely in white color. The image obtained was transferred to the Image-Pro plus software and we estimated the percentage of black in the image, which corresponded to the sinusoidal space.

After digital acquisition of the histological sections immunolabeling for smooth muscle, based on the same resolutions and by using the same software, we selected the smooth muscle that was evidenced in brown. After selection, we created a mask based on the smooth muscle labeled, white being the muscle and black the rest. This image was transferred the Image-Pro plus software and by using the histogram tool, we estimated the percentage of white in the image, thus quantifying the smooth muscle.

We termed “density” of a structural component, as the division of the result of the component analyzed by the total area of the corpora cavernosa section. In this work, for example the collagen density corresponds to the division of the collagen area by the corpora cavernosa area in one given section (Figure 3).

We termed “absolute value” the percentage of a given analyzed component in relation to the total image delimited by the square shown in Figures 1 and 2.

For the evaluation of the 2 groups sacrificed in the first month, we used the Student’s t-test for comparison between the means. For the 3 groups sacrificed after 2 months we used the ANOVA with a Bonferroni post-test.

## RESULTS

The results are shown in Tables 1 to 4 and in Figure 6.

The determination of serum testosterone levels showed that orchiectomy was effective, with undetected testosterone levels in castrated rats sacrificed at 1 and 2 months (Figures 4 and 5). Hormonal replacement in the group-T was effective with serum testosterone levels similar to controls after 1 month of replacement with testosterone in rats that underwent orchiectomy 1 month before hormonal treatment (Figure 5).

The results showed a significant decrease in the absolute values of collagen, smooth muscle, sinusoidal space and total area of corpora cavernosa after 2 months in the castrated group when compared with controls. Overall, as regards density, no significant differences were observed among the groups. The hormonal replacement with testosterone was able to reverse the alterations observed, demonstrating an increase in the elements studied.

## DISCUSSION

The increasing aging population, which is complimentary to the need for a satisfactory quality of life, has stimulated the search for solutions that would soften the alterations secondary to the aging process. Among the most important alterations that affect the aging male, androgen deficiency with erectile dysfunction remains prominent.

The maintenance of an active sexual life depends on the trophism of penile erectile structures, which are affected by low levels of serum testosterone<sup>(21,26,27)</sup>. The analysis of testosterone levels permitted us to test the hypothesis that variations in serum testosterone will determine alterations in the rat corpora cavernosa, as was found in the present work. The remaining question was to determine if the penile structures are definitely affected by testosterone deficiency. Therefore, in the present work, we attempted to simulate, in an animal model, the more frequent clinical situation, that is, testosterone

deficiency for a long period of time, because patients usually are diagnosed at a late stage. Therefore, we analyzed, the long-time structural alterations of castration (1 and 2 months), as well as the effects of testosterone replacement 1 month after castration, in the rat corpora cavernosa.

Several authors have reported the effects of castration on penile structures and corpora cavernosa physiology, as well as the effects of hormonal replacement on the penis of castrated animals (<sup>22,26,28,29</sup>). Traish et al (24) analyzed the structures of corpora cavernosa in rabbits sacrificed 2 weeks after castration and observed a decrease in smooth muscle cells when compared with controls while the group that underwent testosterone replacement 1 week after castration presented values of smooth muscle similar to controls. These authors also found an increase in collagen content in the castrated group when compared with controls, while the group that underwent hormonal replacement present collagen amount similar to controls. Shem et al (22) performed a quantitative analysis under scanning electron microscopy and found an increase in collagen content and a decrease in smooth muscle and sinusoids in rats that underwent orchiectomy and were sacrificed after 1 month. The supposed divergence between previous papers and our results could be because the authors did not take into account the absolute value, considering only the density, as final values are in fact influenced by the decrease in the total area of the penis. Moreover, in these previous reports, the analyses were performed after a short period of time of castration.

The increase in collagen density in the orchietomized group (ORCHIEC-1) when compared to controls (C-1) is relative. The final value for density is based on the division between the collagen area and the transverse section area of the corpora cavernosa. Since both are reduced after orchiectomy, and the transverse section area presented greater decrease (21%) than the collagen decrease (15%), the final value for density is apparently increased.

The evaluation of collagen density in the group of rats sacrificed after 2 months of orchiectomy showed that there was no significant difference when compared to controls, since the collagen variation where accompanied by the variation in the transverse section area of corpora cavernosa, thus maintaining similar proportions (collagen / area) between the groups (Table 2). The absolute values showed that the orchietomized rats who underwent testosterone

replacement (group T) presented a significant increase in collagen amount when compared to the orchiectomy group without hormonal replacement (ORCHIEC-2). Nevertheless, when these groups are separately compared to controls (C-2), there are no significant differences (Table 4).

Smooth muscle presented a decrease in the absolute values only in the second month after orchiectomy (Table 3). In this group, analyzed 2 months after orchiectomy, the difference was considered significant, showing a decrease of 45% in smooth muscle when compared with controls. The group that underwent orchiectomy and hormonal replacement with testosterone showed absolute values similar to controls, demonstrating that hormonal replacement was effective in reversing the process that leads to smooth muscle decrease (Table 4).

The density of sinusoidal space did not undergo significant alterations after 1 or 2 months of orchiectomy (Tables 1 and 2). Similarly to what occurred with collagen, the transverse section area of the corpora cavernosa follows the sinusoidal space variation. Nevertheless, the absolute values of sinusoidal space in the group sacrificed 2 months after orchiectomy, showed significant differences when compared with control and hormonal replacement groups. The group that underwent orchiectomy (ORCHIEC-2) presented a decrease of 35% in the sinusoidal space area when compared with controls (C2), while the hormonal replacement group (T) showed values similar to controls (Table 4). In this case, the hormonal replacement was effective in restoring the area of sinusoidal spaces to normal values.

The sinusoidal space analysis suggests two hypotheses that would justify the erectile dysfunction in patients with low testosterone levels. In the first hypothesis, we would suppose that the decrease in the sinusoidal space is a consequence of a decrease in intracavernous pressure, secondary to a venous leak that accompanies testosterone deficiency (11). The sinusoidal filling would be incomplete because of low wall distension consequent to a low intracavernous blood pressure. In the second hypothesis, the reduction in the sinusoidal space would be a primary event, consequent to a low compliance of sinusoidal walls. In both hypotheses, the sinusoids were not able to compress the deep circumflex veins against the tunica albuginea, resulting in venous leak and low intracavernous pressure (11).

In the group that underwent orchiectomy, we found a reduction in collagen, smooth muscle and sinusoidal space. This determined a decrease in the transverse section area of the corpora cavernosa (Figure-6). The decrease was relatively low in the first month and was more accentuated in the second month; nevertheless, the proportion of the different elements analyzed was maintained in both groups that underwent orchiectomy. Following hormonal replacement, the alterations resulting from orchiectomy were reversed, and the structures affected presented values similar to controls. The method used for this research allowed demonstrating that absolute values are reliable to quantify the structural alterations of corpora cavernosa structures. Our results suggest that hormonal replacement, even when instituted at a late stage, is effective in reversing the corpora cavernosa alterations produced by castration.

## REFERENCES

1. Lunenfeld B. Androgen therapy in the aging male. *World J Urol* 2003;21:292-305.
2. Araujo AB, O'Donnell AB, Brambilla DJ, et al. Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men: estimates from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5920-6.
3. Bancroft J. Hormones and human sexual behavior. *J Sex Marital Ther* 1984;10:3-21.
4. Bancroft J, Wu FC. Changes in erectile responsiveness during androgen replacement therapy. *Arch Sex Behav* 1983;12:59-66.
5. Carani C, Granata AR, Bancroft J, Marrama P. The effects of testosterone replacement on nocturnal penile tumescence and rigidity and erectile response to visual erotic stimuli in hypogonadal men. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20:743-53.
6. Granata AR RV, Lerch A, Marrama P, Carani C. Relationship between sleep-related erections and testosterone levels in men. *J Androl* 1997;18:522-7.
7. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, et al. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E1172-81.
8. Buena F, Swerdloff RS, Steiner BS, et al. Sexual function does not change when serum testosterone levels are pharmacologically varied within the normal male range. *Fertil Steril* 1993;59:1118-23.
9. Gooren LJ. Androgen levels and sex functions in testosterone-treated hypogonadal men. *Arch Sex Behav* 1987;16:463-73.
10. Salmimies P, Kockott G, Pirke KM, Vogt HJ, Schill WB. Effects of testosterone replacement on sexual behavior in hypogonadal men. *Arch Sex Behav* 1982;11:345-53.
11. Schiavi RC, Rehman J. Sexuality and aging. *Urol Clin North Am* 1995;22:711-26.
12. Gray PB, Singh AB, Woodhouse LJ, et al. Dose-dependent effects of testosterone on sexual function, mood, and visuospatial cognition in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3838-46.
13. Huang XB, Xiong CL, Yu CG, Zhou JL, Shen JY. Effect of sildenafil citrate on penile erection of rhesus macaques. *Asian J Androl* 2004;6:233-5.
14. Park JY, Son H, Kim SW, Paick JS. Potentiation of apomorphine effect on sildenafil-induced penile erection in conscious rabbits. *Asian J Androl* 2004;6:205-9.
15. de Tejada IS. Therapeutic strategies for optimizing PDE-5 inhibitor therapy in patients with erectile dysfunction considered difficult or challenging to treat. *Int J Impot Res* 2004;16 Suppl 1:S40-2.
16. Park K, Ku JH, Kim SW, Paick JS. Risk factors in predicting a poor response to sildenafil citrate in elderly men with erectile dysfunction. *BJU Int* 2005;95:366-70.
17. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, et al. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *Eur Urol* 2005;48:1-4.
18. Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 1995;75:191-236.
19. Udelson D, Nehra A, Hatzichristou DG, et al. Engineering analysis of penile hemodynamic and structural-dynamic relationships: Part I--Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int J Impot Res* 1998;10:15-24.

20. Moreland RB. Is there a role of hypoxemia in penile fibrosis: a viewpoint presented to the Society for the Study of Impotence. *Int J Impot Res* 1998;10:113-20.
21. Shen ZJ, Zhou XL, Lu YL, Chen ZD. Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian J Androl* 2003;5:33-6.
22. Traish AM, Park K, Dhir V, Kim NN, Moreland RB, Goldstein I. Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology* 1999;140:1861-8.
23. Callies F, Kollenkirchen U, von zur Muhlen C, Tomaszewski M, Beer S, Allolio B. Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003;111:203-8.
24. Montes GS, Cotta-Pereira, G; Junqueira, L.C.U. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system. *Advance in Cellular Neurobiology* 1984;5:177 - 218.
25. Junqueira LC, Carneiro, J. *Histologia Básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
26. Alcorn JF, Toepfer JR, Leipheimer RE. The effects of castration on relaxation of rat corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J Urol* 1999;161:686-9.
27. Gooren LJ, Saad F. Recent insights into androgen action on the anatomical and physiological substrate of penile erection. *Asian J Androl* 2006;8:3-9.
28. Dai YT, Stopper V, Lewis R, Mills T. Effects of castration and testosterone replacement on veno-occlusion during penile erection in the rat. *Asian J Androl* 1999;1:53-9.
29. Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod* 1992;46:342-8.
30. Morales A, Lunenfeld B. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. *Aging Male* 2002;5:74-86.
31. Morley JE, Perry HM, 3rd. Androgen deficiency in aging men. *Med Clin North Am* 1999;83:1279-89, vii.
32. Heaton JP, Varrin SJ. Effects of castration and exogenous testosterone supplementation in an animal model of penile erection. *J Urol* 1994;151:797-800.
33. Li Z W, Y. X., Zheng S, Xiang ZQ, Han YF. The effects of testosterone undecanoate on relaxation of rat corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2002;8:130-3.
34. Mills TM, Reilly CM, Lewis RW. Androgens and penile erection: a review. *J Androl* 1996;17:633-8.
35. Nehra A, Azadzo KM, Moreland RB, et al. Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. *J Urol* 1998;159:2229-36.
36. Traish AM, Guay AT. Are androgens critical for penile erections in humans? Examining the clinical and preclinical evidence. *J Sex Med* 2006;3:382-404; discussion -7.