



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carina Teixeira Ribeiro

Avaliação dos efeitos imediatos e tardios em testículos e pênis de ratos adultos submetidos ao estresse crônico por imobilização antes e após a puberdade

Rio de Janeiro

2018

Carina Teixeira Ribeiro

Avaliação dos efeitos imediatos e tardios em testículos e pênis de ratos adultos submetidos ao estresse crônico por imobilização antes e após a puberdade

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R484 Ribeiro, Carina Teixeira.

Avaliação dos efeitos imediatos e tardios em testículos e pênis de ratos adultos submetidos ao estresse crônico por imobilização antes e após a puberdade / Carina Teixeira Ribeiro. – 2018.
1251 f.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Testículo – Teses. 2. Pênis - Teses. 3. Espermatogênese – Teses. 4. Estresse – Teses. 5. Camundongos – Teses. 6. Imobilização. I. Souza, Diogo Benchimol de. II. Sampaio, Marco Aurélio Pereira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 611.631

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7/ 5302

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

Assinatura

Data

Carina Teixeira Ribeiro

Avaliação dos efeitos imediatos e tardios em testículos e pênis de ratos adultos submetidos ao estresse crônico por imobilização antes e após a puberdade

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Apresentada em 11 de Abril de 2018.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio
Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof. Dr. Carlos Pedro Fontes Oliveira
Universidade do Porto

Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Francisco de Assis Ribeiro e Maria do Carmo Teixeira Ribeiro, por todo apoio a mim concedido para que eu alcançasse meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Francisco José Barcellos Sampaio, Coordenador geral do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Área de Concentração – Sistema Urogenital - Unidade de Pesquisa Urogenital do Departamento de Anatomia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por todo ensinamento e estrutura necessária para o desenvolvimento dos projetos de todos.

Ao professor Doutor José Horácio Costa Aboudib Jr, Coordenador adjunto do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

Aos meus orientadores Doutor Diogo Benchimol de Souza e Doutor Marco Aurélio Pereira Sampaio pela confiança em mim depositada, por toda atenção, orientação e dedicação fundamentais para a concretização deste trabalho.

Ao professor Doutor Waldemar Silva Costa por todo incentivo, dedicação e atenção fundamentais.

Às professoras Doutoradas Bianca Martins Gregório e Carla Braga Mano Gallo por todo incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Ainda, agradeço à Capes pelo suporte financeiro para a realização do Doutorado Sanduíche na Universidade do Porto, Portugal, nº do processo 88881.135454/2016-1. Aos Professores Doutores Pedro Fontes Oliveira e Marco Gouveia Alves e todo o grupo de Biologia Celular da Universidade do Porto pelo acolhimento e aprendizado. A Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas por todo incentivo para a realização deste projeto.

Ao aluno de iniciação científica deste trabalho, Marcello Duarte, por todo seu empenho e dedicação para a concretização deste trabalho. Aos demais alunos de iniciação científica, que ao longo desses anos sempre auxiliaram no que foi preciso.

A todos os colegas da Unidade de Pesquisa Urogenital por todo apoio de sempre.

À minha família e amigos por sempre estarem ao meu lado.

Os meus sinceros agradecimentos a todos vocês.

RESUMO

TEIXEIRA RIBEIRO, Carina. *Avaliação dos efeitos imediatos e tardios em testículos e pênis de ratos adultos submetidos ao estresse crônico por imobilização antes e após a puberdade*. 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do estresse crônico nos testículos e pênis de ratos pré-púberes e adultos, e avaliar se possíveis alterações podem ser revertidas quando a indução do estresse é cessada. Os animais foram imobilizados em cilindros opacos de plástico por duas horas diárias durante seis semanas para simular uma situação de estresse crônico. Setenta e seis ratos foram divididos em oito grupos dependendo do tipo de tratamento (controle ou estressado), da idade em que o estresse foi iniciado (pré-púbere, 4 semanas de idade) ou (adulto, 10 semanas de idade), e do tempo de avaliação (imediato ou tardio). Os animais estressados de avaliação imediata (ECI4, n=10 e ECI10, n=9) foram analisados 24 horas após o último estímulo estressor, enquanto que os animais estressados de avaliação tardia (ECT4, n=10 e ECT10, n=9) foram avaliados 6 semanas após o último estímulo estressor. Outros animais de mesma idade foram usados como grupo controle (CI4, CT4, CI10 e CT10) mantidos sem água e alimento pelo mesmo período de tempo dos animais dos grupos estressados. Experimento aprovado sob protocolo CEUA/004/2015. Os animais foram pesados antes e após o término do tratamento. Antes da morte do animal, o sangue foi coletado para análise da testosterona sérica e os espermatozoides coletados da cauda do epidídimo para avaliação da concentração, motilidade e viabilidade. Os testículos foram fixados em Bouin por 24 horas e pós-fixados em formaldeído a 3,7%, processados em blocos de parafina e corados em H&E. Os cortes foram fotografados em diferentes aumentos para análises do diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio seminífero, densidade volumétrica e volume absoluto das estruturas do túbulo seminífero e do estroma. O pênis foi fixado em formaldeído a 3,7% e a porção média foi utilizada para análise histomorfométrica. Secções transversais dessa região foram coradas com Tricrômico de Masson para avaliação da área do corpo cavernoso (com e sem túnica albugínea), área da túnica albugínea e densidades das estruturas cavernosas. Corado com fucsina resorcina de Weigert com prévia oxidação para avaliação das fibras do sistema elástico. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste T de Student e considerado significativo quando $p < 0,05$. Os ratos do grupo ECI4 apresentaram redução do peso corporal e do diâmetro dos túbulos seminíferos. Os ratos do grupo ECI10 mostraram várias reduções funcionais (nível de testosterona e parâmetros de espermatozóides) e morfológicas (peso testicular, diâmetro dos túbulos seminíferos e estruturas do corpo cavernoso). Os ratos do grupo ECT4 mostraram aumento do peso corporal e das densidades volumétricas e absolutas do compartimento intertubular, e diminuição da densidade volumétrica do compartimento tubular e das fibras do sistema elástico no corpo cavernoso. O grupo ECT10 apresentou redução da viabilidade dos espermatozóides e aumento da área da túnica albugínea do corpo cavernoso. O estresse crônico induziu alterações testiculares e penianas antes e após a puberdade. As alterações foram mais significativas quando o estímulo estressor foi induzido na idade adulta, porém se recuperam quase completamente após longo período sem estresse. Já nos animais pré-púberes as alterações parecem ser permanentes.

Palavras-chave: Estresse crônico. Morfometria. Ratos. Testículo. Pênis.

ABSTRACT

TEIXEIRA RIBEIRO, Carina. *Evaluation of the immediate or later effects in testicles and penis of adult rats submitted to the chronic stress by immobilization before and after puberty.* 2018. XX f. 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The aim of this study was to investigate the effects of chronic stress on the testes and penis of prepubertal and adult rats and to assess possible alterations could be reversed when stress induction is ended. The animals were immobilized in opaque plastic cylinders for two hours daily for six weeks. Seventy six rats were assigned into eight groups depending on the type of treatment (control or stressed), of the age at which the stress was initiated (prepubertal, 4 weeks of age) or (adult, 10 weeks of age), and the time of evaluation (immediate or late). The stressed animals for immediate evaluation (ECI4, n = 10 and ECI10, n = 9) were analyzed 24 hours after the last stressor stimulus, whereas the stressed animals for late evaluation (ECT4, n = 10 and ECT10, n = 9) were analyzed six weeks after the last stressor stimulus. Other animals the same age were used as controls (CI4, CT4, CI10 and CT10) kept free, without food and water for the same period of the animals of the stressed groups. Experiment approved under protocol CEUA/004/2015. The animals were weighed before and after the end of treatment. Before the death of the animal, the blood was collected for analysis of the testosterone and the spermatozoa collected from the tail of the epididymis for evaluation of concentration, motility and viability. The testes were fixed in Bouin for 24 hours and postfixed in 3.7% formaldehyde, processed in paraffin blocks and stained by H&E. The sections were photographed at different magnifications for analysis of the seminiferous tubule diameter, height of the seminiferous epithelium, volume density and absolute volume of the seminiferous and stromal structures. The penis was fixed in 3.7% formaldehyde and its mid-shaft was used for histomorphometric analysis. Cross sections of this region were stained with Masson's Trichomic to evaluate the area of the corpus cavernosum (with and without the tunica albuginea), area of the tunica albuginea and densities of the cavernous structures. It was stained with Weigert's resorcin-fuchsin with previous oxidation to evaluate the elastic system fibers. The data were organized and the mean of each group were analyzed and compared by Student's t-test. The rats of the ECI4 group had a reduction in body weight and diameter of the seminiferous tubules. The rats of the ECI10 group showed several functional and morphological (testicular weight, diameter of the seminiferous tubules and structures of the corpora cavernosa) reductions. The rats in the ECT4 group showed increased body weight and of intertubular compartment volumetric and absolute densities and reducing tubular compartment volumetric density and fibers of the elastic system in the corpus cavernosum. The ECT10 group presented reduction of sperm viability and increased area of the tunica albuginea of penis. The chronic stress induced changes in testicles and penises before and after puberty. Nevertheless, the alterations were more significant when the stress stimuli were induced in adulthood; however, these animals recovered almost completely after a long time without stress. Already in the prepubertal animals the alterations appear permanent.

Key-words: Chronic stress. Morphometric. Rat. Testicle. Penis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagem esquemática do corte longitudinal do testículo (A), seguido pela imagem ampliada do corte transversal de um túbulo seminífero (B).....	20
Figura 2.	Ilustração do corte transversal do pênis humano.....	23
Figura 3.	Diagrama da divisão dos grupos experimentais.....	31
Figura 4.	Imagem dos tubos utilizados para a indução do estresse crônico.....	32
Figura 5.	Fotografias mostrando a retirada dos testículos e pênis.....	33
Figura 6.	Fotografia da fragmentação da cauda do epidídimo.....	35
Figura 7.	Fotomicrografia do corte transversal dos túbulos seminíferos do testículo de rato.....	38
Figura 8.	Fotomicrografia do corte transversal dos túbulos seminíferos do testículo de rato.....	39
Figura 9.	Fotomicrografia do corte transversal dos túbulos seminíferos do testículo de rato.....	41
Figura 10.	Fotomicrografia do corte transversal da porção média do pênis de rato.....	43
Figura 11.	Fotomicrografia do corte transversal do corpo cavernoso do pênis de rato..	44
Figura 12.	Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos pré-púberes de avaliação imediata.....	47
Figura 13.	Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos adultos de avaliação imediata.....	52
Figura 14.	Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos de avaliação imediata.....	52
Figura 15.	Fotomicrografias do corte transversal do pênis de ratos adultos de avaliação imediata.....	53
Figura 16.	Fotomicrografias do corte transversal do corpo cavernoso do pênis dos ratos adultos de avaliação imediata.....	54
Figura 17.	Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos pré-púberes de avaliação tardia.....	57

Figura 18.	Fotomicrografias do corte transversal do pênis dos ratos adultos e pré-púberes de avaliação tardia.....	58
Figura 19	Fotomicrografias do corte transversal do pênis dos ratos adultos de avaliação tardia.....	62
Figura 20	Fotomicrografias do corte transversal do corpo cavernoso do pênis dos adultos de avaliação tardia.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Diâmetro do túbulo seminífero.....	46
Gráfico 2	Motilidade espermática.....	50
Gráfico 3	Viabilidade espermática.....	50
Gráfico 4	Concentração de testosterona sérica.....	50
Gráfico 5	Diâmetro do túbulo seminífero.....	51
Gráfico 6	Viabilidade espermática.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CI4) e estressado (ECI4) de ratos pré-púbere de avaliação imediata.....	48
Tabela 2	Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CI10) e estressado (ECI10) de ratos adultos de avaliação imediata.....	55
Tabela 3	Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CT4) e estressado (ECT4) de ratos pré-púberes de avaliação tardia.....	59
Tabela 4	Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CT10) e estressado (ECT10) de ratos adultos de avaliação tardia.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA –	albumina de soro bovino
CEUA -	Comissão de Ética para o Cuidado e Uso com Animais
CI10 -	animais controles com 10 semanas de idade do grupo de avaliação imediata
CI4 -	animais controles com 4 semanas de idade do grupo de avaliação imediata
CRH -	hormônio liberador de corticotrofina
CT10 -	animais controles com 10 semanas de idade do grupo de avaliação tardia
CT4 -	animais controles com 4 semanas de idade do grupo de avaliação tardia
DNA -	ácido desoxirribonucleico
ECI10 -	animais submetidos ao estresse crônico a partir de 10 semanas de idade do grupo de avaliação imediata
ECI4 -	animais submetidos ao estresse crônico a partir de 4 semanas de idade do grupo de avaliação imediata
ECT10 -	animais submetidos ao estresse crônico a partir de 10 semanas de idade do grupo de avaliação tardia
ECT4 -	animais submetidos ao estresse crônico a partir de 4 semanas de idade do grupo de avaliação tardia
ELISA –	ensaio imunoenzimático
ROS –	espécies reativas de oxigênio
FSH –	hormônio folículo estimulante
H&E –	hematoxilina e eosina
LH –	hormônio luteinizante
PBS-	solução tampão fosfato-salino
FCR –	força centrífuga relativa
Vv -	densidade volumétrica
Av –	volume absoluto
eNO-	óxido nítrico endotelial
nNO-	óxido nítrico neuronal
DE –	disfunção erétil
cGMP-	monofosfato cíclico de guanosina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus celsius

% - porcentagem

μm - micrômetro

g - grama

± mais ou menos

n - número amostral

mg - miligrama

Kg - kilograma

ml - mililitro

μl – microlitro

vs - versus

x - multiplicação

< - menor que

> - maior que

= - igual

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1	Morfofisiologia dos testículos.....	17
1.2	Morfofisiologia do pênis.....	21
1.3	Estresse crônico e sua ação sobre os testículos e pênis.....	24
2	OBJETIVOS	29
2.1	Geral	29
2.2	Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Animais.....	30
3.2	Estresse crônico.....	31
3.3	Eutanásia e coleta do material.....	33
3.4	Avaliações biométricas.....	34
3.5	Avaliações dos espermatozoides.....	34
3.5.1	<u>Concentração e motilidade dos espermatozoides.....</u>	35
3.5.2	<u>Viabilidade dos espermatozoides.....</u>	36
3.6	Testosterona sérica.....	36
3.7	Análises morfométricas.....	37
3.7.1	<u>Testículos.....</u>	37
3.7.1.1	Diâmetro do túbulo seminífero.....	38
3.7.1.2	Altura do epitélio seminífero.....	39
3.7.1.3	Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares.....	40
3.7.1.4	Volume absoluto das diferentes estruturas testiculares.....	41
3.7.2	<u>Pênis.....</u>	42
3.7.2.1	Avaliação das áreas do corpo cavernoso (com e sem túnica albugínea) e da área da túnica albugínea.....	42
3.7.2.2	Densidade das estruturas do corpo cavernoso	43
3.8	Análise estatística.....	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Efeitos imediatos do estresse crônico em ratos pré-púberes.....	45

4.1.1	<u>Análises Biométricas</u>	45
4.1.2	<u>Análises dos espermatozoides e da testosterona sérica</u>	45
4.1.3	<u>Análises histomorfométricas</u>	46
4.2	Efeitos imediatos do estresse crônico em ratos adultos	49
4.2.1	<u>Análises biométricas</u>	49
4.2.2	<u>Análises dos espermatozoides e testosterona sérica</u>	49
4.2.3	<u>Análises histomorfométricas</u>	51
4.3	Efeitos tardios do estresse crônico em ratos pré-púberes	56
4.3.1	<u>Análises biométricas</u>	56
4.3.2	<u>Análises dos espermatozoides e testosterona sérica</u>	56
4.3.3	<u>Análises histomorfométricas</u>	56
4.4	Efeitos tardios do estresse crônico em ratos adultos	60
4.4.1	<u>Análises biométricas</u>	60
4.4.2	<u>Análises dos espermatozoides e testosterona sérica</u>	60
4.4.3	<u>Análises histomorfométricas</u>	61
5	DISCUSSÃO	65
5.1	Testículos	65
5.2	Pênis	68
	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A - Soluções utilizadas no experimento	78
	APÊNDICE B - Protocolos de ensaio imunoenzimático e de histoquímica.....	79
	APÊNDICE C Primeiro artigo publicado.....	82
	APÊNDICE D – Segundo artigo submetido.....	90
	ANEXO – Autorização da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais.....	125

INTRODUÇÃO

Todo organismo para manter o perfeito funcionamento de suas funções orgânicas, dispõe de um complexo mecanismo homeostático (Chrousos and Gold 1992). No entanto, quando o organismo é submetido a qualquer evento capaz de provocar um desequilíbrio das suas funções, a isso denomina-se de estresse (Schneiderman, Ironson et al. 2005). Fatores psicológicos estão entre as causas mais comuns relacionados ao estresse no homem, em que as principais causas são decorrentes de perdas, pressão no trabalho, divórcio, desemprego entre outros (Schneiderman, Ironson et al. 2005; Shields and Slavich 2017). Tais condições podem induzir o surgimento de várias enfermidades e ou distúrbios como ansiedade, depressão, problemas cardiovasculares, doenças autoimunes, obesidade, síndrome metabólica e problemas reprodutivos (Nordkap, Jensen et al. 2016; Shields and Slavich 2017).

O estilo de vida estressante do homem está correlacionado a inúmeros problemas de saúde (Schneiderman, Ironson et al. 2005; Shields and Slavich 2017). A saúde sexual e reprodutiva é bastante afetada e muitos casos de infertilidade em casais estão relacionados ao estresse (Sheiner, Sheiner et al. 2003). No homem, por exemplo, o estresse pode provocar baixa qualidade dos espermatozoides e disfunção erétil (DE) (Hedon 2003; Janevic, Kahn et al. 2014). Estudos que correlacionam o estresse a problemas de fertilidade masculina ou a problemas de ereção, foram realizados em homens ou em modelo animal adulto. O que ainda não se conhece é se o estresse aplicado na infância (antes da maturidade sexual) pode causar os problemas masculinos supracitados. Um estudo mostra que crianças afetadas por eventos estressantes desenvolvem danos persistentes no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, havendo liberação suprafisiológica do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na idade adulta. Este hormônio é o responsável pela indução e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula a liberação via ação no córtex adrenal, dos hormônios do estresse, os glicocorticóides (Heim, Newport et al. 2000).

Decorrente dessa relação negativa entre o estresse e problemas sexuais e reprodutivos masculinos, os estudos nessa temática se intensificaram. Dentre os órgãos do sistema reprodutor masculino, os testículos foram os mais estudados. Isso porque os testículos são os órgãos responsáveis pela produção dos espermatozoides e do principal hormônio masculino, a testosterona. Por serem, também, órgãos com intensa atividade proliferativa, são mais vulneráveis às situações de estresse (Kanter, Aktas and Erboga 2013). Esta vulnerabilidade pode prejudicar a produção e a qualidade dos espermatozoides, condições condizentes com

subfertilidade masculina. Aproximadamente 15% dos casais em todo o mundo apresentam problemas de infertilidade, sendo que os homens são responsáveis por 20-30% dos casos e contribuem para 50% dos casos em geral (Agarwal, Mulgund et al. 2015). A avaliação da qualidade do sêmen é o primeiro passo para diagnosticar infertilidade masculina (Ahmadi, Yasemi et al. 2014). Muitos fatores estão relacionados à redução da espermatogênese e a alterações dos espermatozoides, e essa situação vem se agravando ao longo do tempo. Alguns estudos mostraram que fatores relacionados ao estilo de vida do homem, dentre eles o estresse, vêm contribuindo para essa estatística negativa sobre a fertilidade masculina (Durairajanayagam 2018). O estresse tornou-se, portanto, um fator de risco considerável para saúde reprodutiva (Sheiner, Sheiner et al. 2003).

Outro importante problema masculino, em que o estresse também é considerado uma das principais causas, é a disfunção erétil. A DE é definida como a incapacidade de atingir e/ou manter uma ereção peniana suficiente para uma relação sexual satisfatória (Yucel, Keskin et al. 2017). A DE pode acometer homens de qualquer idade, no entanto, é maior com o avanço da idade (50 a 100% em homens acima dos 70 anos) e em homens abaixo dos 40 anos de idade esse índice chega aos 10%, considerado um índice preocupante para essa faixa etária (McCabe, Sharlip et al. 2016). Entretanto, o pênis ainda é muito pouco estudado sob estresse crônico.

No entanto, o grau de injúria no sistema reprodutor masculino sob estresse crônico depende de uma série de fatores, principalmente em relação ao tipo, a intensidade e a duração do estresse, bem como a natureza do estressor e as características individuais do organismo afetado (por ex.: genética, idade, metabolismo, etc) (Schneiderman, Ironson et al. 2005).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Morfofisiologia do testículo

Os testículos dos mamíferos são órgãos possuem tanto uma função endócrina, com síntese e liberação de hormônios esteroides com destaque para a testosterona, quanto de uma função exócrina com produção e liberação dos gametas masculinos (espermatozoides). Seu desenvolvimento inicialmente ocorre na cavidade abdominal, e no decorrer do desenvolvimento esses órgãos deixam esta cavidade para então se alojarem no escroto. Ao fazerem isso, os testículos levam consigo um saco de membrana serosa, derivada do peritônio, que possui uma lâmina visceral, que envolve os testículos, e outra parietal denominada de túnica vaginal. Ainda trazem as fâscias espermáticas interna e externa derivadas dos músculos transversos do abdômen e do oblíquo abdominal externo, respectivamente, e a fâscia cremastérica derivado do músculo oblíquo abdominal interno (Russel et al. 1990; Richard L. Drake 2015).

Estruturalmente, os testículos possuem uma capsula de consistência mais densa, composta principalmente por tecido fibroso, denominada de túnica albugínea. Esta por sua vez possui não somente uma função protetora do parênquima testicular, mas também está relacionada com a regulação da pressão intratesticular e do fluxo sanguíneo, como da movimentação espermática através de contrações rítmicas. Isso deve-se ao fato da túnica albugínea conter células contráteis (Svingen and Koopman 2013).

Internamente, os testículos ainda são divididos em compartimentos tubular e intertubular (parênquima testicular). O primeiro compreende os túbulos seminíferos que são constituídos de uma maneira geral por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. A túnica própria delimita os túbulos seminíferos externamente, sendo composta por membrana basal, fibras colágenas e células mióides. Já o epitélio seminífero é composto por células da linhagem espermatogênica e por células de Sertoli. As células da linhagem espermatogênica são compostas por espermatogônias, células diploides localizadas na região basal, que sofrem sucessivas divisões mitóticas para então originarem a camada subsequente de células, conhecidas por espermatócitos primários, células também diploides. Estas por sua vez realizam a primeira divisão meiótica originando os espermatócitos secundários (células haploides), que sofrem a segunda divisão meiótica para dar origem as espermátides. Por fim, estas sofrem

sucessivas modificações até se transformarem em espermatozoides, processo este denominado de espermiogênese (Figura 1). Durante as sucessivas modificações das espermátides até sua transformação final em espermatozoide, ocorre perda citoplasmática passando a possuir um formato mais alongado. A partir daí, ocorre a formação da cauda ou flagelo do espermatozoide que permite a sua mobilidade. Nesta fase também há formação da cabeça do espermatozoide onde fica localizado o núcleo com o material genético, o DNA. Uma importante estrutura, também desenvolvida neste processo, o acrossomo, fica localizado acima da porção rostral da cabeça do espermatozoide. Esta é uma estrutura essencial para o sucesso da fertilização, pois secreta enzimas indispensáveis que permitem a entrada dos espermatozoides ao oócito. Os espermatozoides então formados são liberados para o lúmen tubular e deste, por mecanismo de propulsão, são direcionados à rede testicular. Esta estrutura conecta-se aos ductos eferentes que desembocam na primeira porção do epidídimo, a cabeça, seguindo para o corpo e finalmente à cauda do epidídimo. O epidídimo então é o local onde os espermatozoides adquirem a motilidade e maturação, ficando armazenados até o momento da ejaculação (Russel et al. 1990; Cooper 2007; Junqueira, Carneiro 2008).

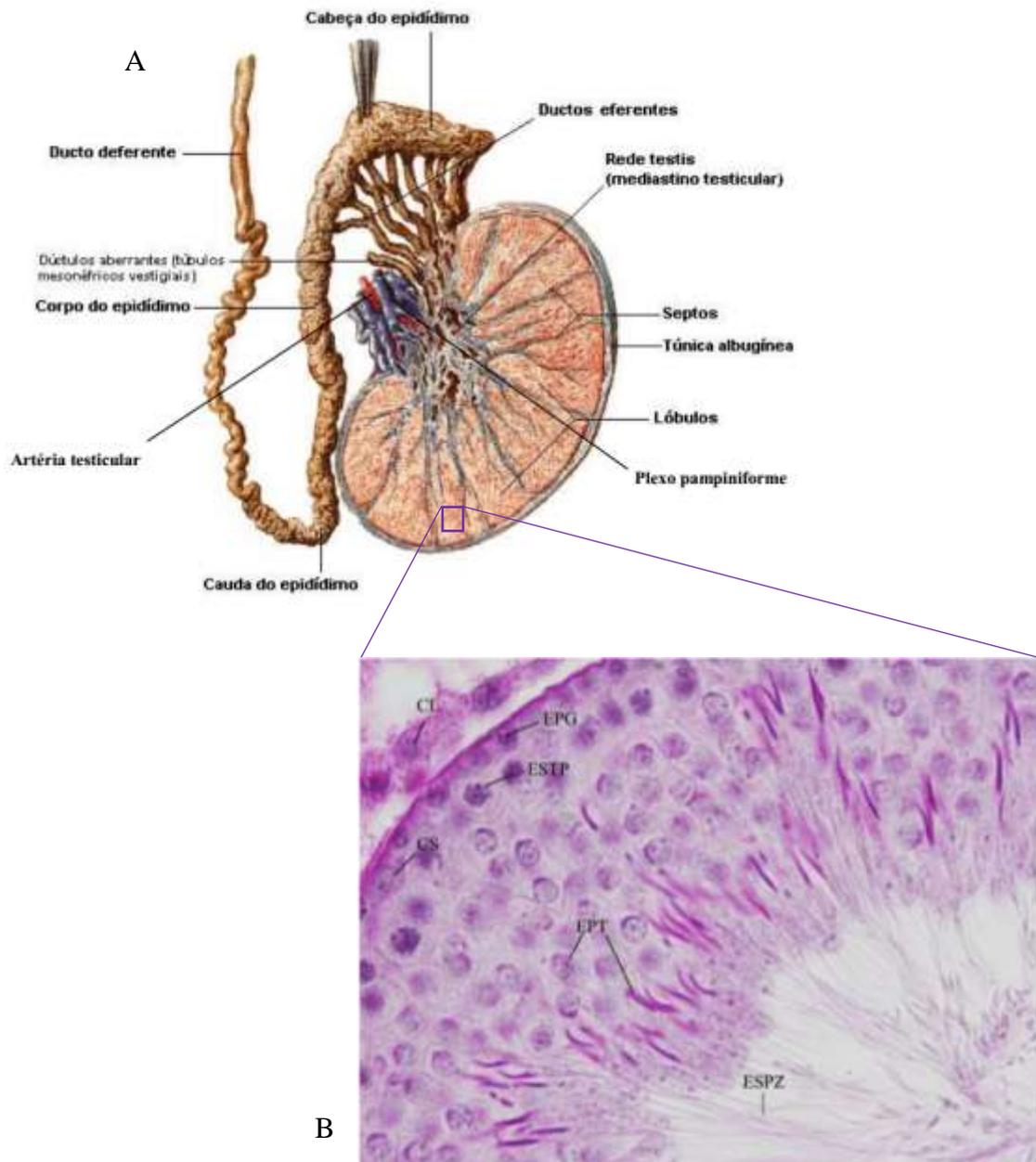
As células de Sertoli, como mencionada anteriormente, são células do epitélio seminífero que possuem sua base aderida à lâmina basal do túbulo seminífero e suas extremidades apicais são dirigidas ao lúmen tubular. Estas células envolvem as células da linhagem espermatogênica como um mecanismo de sustentação. Após a puberdade, as células de Sertoli passam a ser o principal componente estrutural dos túbulos seminíferos, isolando o microambiente tubular através da formação da barreira hematotesticular e tendo como função fundamental o suporte físico e nutricional das células germinativas em desenvolvimento e, ainda, isolando os espermatozoides de atividades e agentes autoimunes (Griswold 1998; Alves, 2013).

O compartimento intertubular, também conhecido como espaço intersticial ou estroma, preenche os espaços entre os túbulos seminíferos. Este compartimento é constituído por nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e por uma vasta população de células que incluem macrófagos, mastócitos, células conjuntivas indiferenciadas, fibroblastos e principalmente células de Leydig (Russel et al. 1990; Junqueira, Carneiro 2008). Estas são as mais abundantes deste compartimento e são as responsáveis pela síntese de testosterona e estradiol a partir do estímulo do hormônio luteinizante (LH) (Dombrowicz, Sente et al. 1996). As células de Leydig começam a se proliferar logo após o nascimento sob estímulo do LH e permanecem quiescentes até a puberdade. Na puberdade ocorre grande proliferação celular com aumento da síntese de testosterona (Dombrowicz, Sente et al. 1996; Zhou, Kudo et al. 1996). Na idade adulta, as

células de Leydig possuem uma população estável com raríssima divisão e morte (Teerds, de Rooij et al. 1989). Os hormônios androgênicos além de serem responsáveis, na fase fetal, pela diferenciação dos órgãos genitais masculinos, na puberdade são responsáveis pelo surgimento dos caracteres sexuais secundários e pelo processo espermatogênico (Dombrowicz, Sente et al. 1996; Zhou, Kudo et al. 1996).

Os testículos são irrigados pela artéria testicular, um ramo da aorta abdominal. A artéria testicular possui formato helicoidal formando algo semelhante a um cone vascular no cordão espermático. Ao penetrar no testículo, a artéria se ramifica em várias arteríolas responsáveis pela distribuição de oxigênio e nutrientes necessários às funções endócrinas e exócrinas do órgão, bem como para a manutenção da sua citoarquitetura. A drenagem dos testículos é realizada por um conjunto de veias denominado plexo pampiniforme, que envolvem a artéria testicular no cordão espermático. Estas veias também participam do controle da termorregulação testicular. Outra parte da drenagem é realizada por vasos linfáticos testiculares que drenam para linfonodos aórticos laterais e linfonodos pré-aórticos. Já a inervação dos testículos é oriunda do plexo nervoso testicular, que contém fibras parassimpáticas vagais aferentes viscerais e fibras simpáticas do segmento T7 da medula espinal (Keith, Moore 2011; Richard L. Drake 2015).

Figura 1. Imagem esquemática do corte longitudinal do testículo (A), seguido pela imagem ampliada do corte transversal de um túbulo seminífero (B).



Legenda. (B) Epitélio seminífero: célula de sertoli (CS), espermatogônia (EPG), espermatócito primário (ESTP) e espermátide (EPT). Espermatozoide (ESPZ). Espaço intersticial: célula de Leydig (CL). PAS, 1000x.

Fonte: (A) adaptado de NETTER FH, 2011. (B) A autora, 2013.

1.2 Morfofisiologia do pênis

No homem o pênis é composto por três corpos de tecido erétil, um corpo esponjoso e um par de corpos cavernosos, uretra e glândula. Os corpos cavernosos, localizados dorsalmente, são tecidos eréteis constituídos por fibras musculares lisas (principal componente), por uma matriz intersticial formada principalmente por colágeno e fibras do sistema elástico, vasos sanguíneos, linfáticos, sinusóides revestidos por endotélio e nervos. São ainda envolvidos por uma bicamada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Esta possui uma camada externa com fibras direcionadas longitudinalmente, enquanto que a camada mais interna possui fibras disposta de forma circular (Figura 2). A partir desta, são irradiadas fibras para o interior do corpo cavernoso formando os pilares intracavernosos que suportam os sinusóides (Goldstein and Padma-Nathan 1990; Hsu, Hsieh et al. 2004; Costa, Carrerete et al. 2006; Yiee and Baskin 2010). Os corpos cavernosos possuem um sulco ventralmente onde localiza-se o outro tecido erétil, o corpo esponjoso. O corpo esponjoso, no entanto, é um tecido erétil com maior quantidade de fibras do sistema elástico, sinusóides maiores e uma túnica albugínea mais fina que o envolve (Yiee and Baskin 2010). A uretra peniana, canal comum à passagem da urina e do sêmen, passa através do corpo esponjoso. O meato uretral externo (abertura externa da uretra) se abre sobre uma superfície ventral na glândula. Esta estrutura por sua vez é a continuação do corpo esponjoso que se molda à porção final dos corpos cavernosos, formando a extremidade distal do pênis. A borda da glândula que se junta à porção final dos corpos cavernosos é conhecida por coroa da glândula. A túnica albugínea que envolve os corpos cavernosos e o corpo esponjoso é ainda circundada por uma fáscia profunda, a fáscia profunda do pênis. Superficial a esta ainda há uma outra fáscia, denominada de fáscia superficial do pênis, sendo então encoberta por pele (Hsieh, Liu et al. 2012).

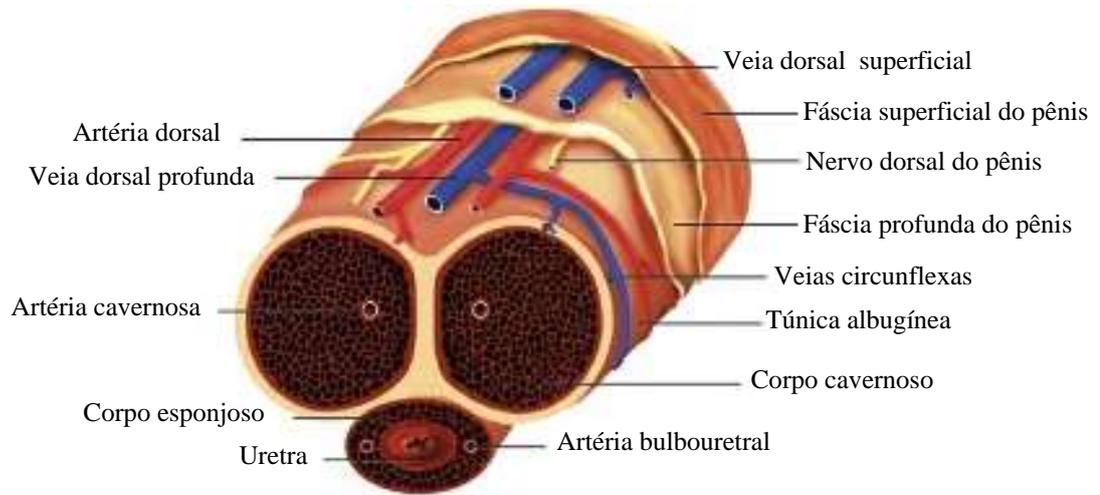
O suprimento sanguíneo do pênis é fornecido por três principais artérias: cavernosa, dorsal e bulbouretral. Todas estas são pares e originárias do ramo da artéria pudenda interna. Já a drenagem venosa é realizada principalmente por uma veia dorsal profunda que corre entre as duas artérias dorsais, localizada na fáscia profunda do pênis logo acima da túnica albugínea. Esta veia recebe drenagem a partir dos dois terços distais do corpo cavernoso através de veias emissárias e, também, das veias circunflexas do corpo esponjoso (Yiee and Baskin 2010). No entanto, um pequeno par de veias dorsais são encontradas profundamente à veia dorsal profunda, que recebem de forma independente drenagem de veias emissárias (Hsu, Hsieh et al. 2003). O suprimento nervoso é proveniente de nervos pudendos que suprem a inervação

somática motora e sensorial. Já os nervos cavernosos combinam fibras aferentes parassimpática e visceral responsáveis pelo suprimento nervoso do tecido erétil (Yiee and Baskin 2010).

A ereção peniana envolve um complexo mecanismo neuroendócrino, vascular e estrutural (Dean and Lue 2005). De forma sucinta, a ereção peniana ocorre da seguinte forma: para o aumento do influxo sanguíneo, a resistência vascular é diminuída e o sangue flui através das artérias cavernosas e helicíneas, havendo ingurgitamento dos sinusoides, expansão e alongamento das estruturas cavernosas. Já o relaxamento do músculo liso envolve ação da acetilcolina, do óxido nítrico neuronal (nNO) e endotelial (eNO), prostaglandinas e ação do componente sacral parassimpático (S2-S4). Com a liberação do nNO nas terminações das fibras nervosas genitais durante a excitação sexual, o relaxamento do músculo liso é então iniciado. A saúde do endotélio também é um fator importante, pois determinará a contribuição do eNO para o processo de ereção. O relaxamento do corpo cavernoso também é regulado pelo monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Outro mecanismo importante envolve a ação da túnica albugínea que se estende e aumenta a pressão intracavernosa. Esta expansão e aumento da pressão intracavernosa comprimem as veias subtunicais contra o túnica albugínea, causando aprisionamento de sangue no corpo cavernoso, referido como mecanismo de veno-oclusão. O pênis torna-se então rígido e ereto. O retorno do pênis ao estado flácido envolve uma ação reversa em que ocorre contração muscular lisa através da ação da fosfodiesterase tipo 5 (enzima responsável pela destruição do cGMP), redução do fluxo sanguíneo arterial e liberação do mecanismo veno-oclusivo (van Driel 2015). As estruturas penianas são ainda moduladas por ação hormonal, principalmente por andrógenos. Estes possuem um papel importante na manutenção das estruturas penianas e no mecanismo da ereção. Deficiência desses hormônios estão implicados principalmente com alterações estruturais e comprometimento da ereção (Wang, Xu et al. 2015). A integridade das estruturas supracitadas, associada ao complexo mecanismo neuroendócrino e vascular, é fundamental para o sucesso da ereção (Dean and Lue 2005).

O pênis do rato é dividido em raíz, corpo e glande. O corpo do pênis e a glande se conectam em um ângulo reto. O corpo do pênis é constituído por um corpo cavernoso, um corpo esponjoso, uretra peniana, uma veia dorsal, um par de pequenas artérias dorsais e nervos (Seyam, Kattan et al. 2012). A matriz do corpo cavernoso é predominantemente constituída por tecido conjuntivo (Pinheiro, Costa et al. 2000). A glande possui a uretra do pênis, corpo cavernoso da glande, corpo esponjoso da uretra, elementos fibrocartilagosos e um osso peniano (Murakami 1987).

Figura 2. Ilustração do corte transversal do pênis humano.



Fonte: adaptado de HSU, 2003.

1.3 Estresse crônico e sua ação sobre os testículos e pênis

Existem dois tipos principais de estresse: agudo e crônico. O estresse agudo é caracterizado por promover menos agressão ao organismo, e as eventuais alterações que podem ocorrer são consideradas de natureza temporária. Já o estresse crônico possui um poder de agressão maior, pois o organismo é submetido a eventos estressantes por períodos prolongados, e isso pode decorrer com sequelas permanentes mesmo após o término do estímulo estressor (Garcia-Diaz, Gomez-Quiroz et al. 2015). Entender e estudar as alterações que o estresse crônico pode causar nos diferentes sistemas orgânicos é um desafio para a ciência. Na tentativa de elucidar tais alterações biológicas, são empregadas diversas metodologias para simular uma situação de estresse crônico. Com uso de modelos animais para experimentação, principalmente o rato, são empregados, em sua maioria, métodos físicos e psicológicos de estresse crônico. Dentre esses, os mais utilizados têm sido a restrição de movimentos (imobilização), natação forçada, frio, calor, choque elétrico, retirada precoce da prole ao convívio da mãe e poluição sonora (Almeida, Petenusci et al. 2000; Schneiderman, Ironson et al. 2005; Saki, Rahim et al. 2009; Rasooli, Taha Jalali et al. 2010; Jalali, Saki et al. 2012; Priya and Reddy 2012; Nirupama, Devaki et al. 2013; Garcia-Diaz, Gomez-Quiroz et al. 2015). No entanto, antes de uma abordagem sobre os estudos que mostram os potenciais efeitos deletérios do estresse crônico sobre os testículos e pênis, órgãos alvo deste estudo, uma breve descrição morfofuncional desses órgãos se faz necessária para melhor compreensão das alterações biológicas que o estresse crônico pode causar.

O estresse crônico é capaz de alterar as estruturas e o funcionamento dos testículos e pênis. O mecanismo pelo qual atua é bastante complexo e diversificado. Uma das alterações mais conhecida, talvez a mais importante, é a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA). Quando isso ocorre, o hipotálamo libera dois neurotransmissores (fator liberador de corticotrofina e arginina vasopressina) que irão estimular a hipófise anterior a sintetizar e liberar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Este hormônio é liberado em concentrações elevadas na corrente sanguínea, e irá agir sobre o córtex da adrenal estimulando-a a liberar concentrações, também elevadas, de hormônios glicocorticoides (Armario 2006; Stephens and Wand 2012). O aumento circulante desses hormônios está associado com distúrbios metabólicos. Em ratos cronicamente estressados, os valores dos níveis plasmáticos de corticosterona começam a aumentar nos primeiros 30 minutos de indução do estresse, e este valor permanece elevado até 60 minutos ainda sob estímulo estressor. Depois deste período, com o

organismo ainda sob estímulo estressor, os valores séricos da corticosterona começam a declinar se aproximando aos valores normais (Yazawa, Sasagawa et al. 1999). Mesmo em períodos mínimos de 4 dias e máximo de 60 dias vistos em vários estudos, o estresse crônico é capaz de elevar os níveis plasmáticos de corticosterona. Sendo assim, a dosagem da corticosterona sérica é bastante utilizada como marcador de estresse. Entretanto, deve-se ter cuidado, pois a corticosterona permanece elevada somente por algum período sob estresse como mencionado anteriormente.

O aumento da corticosterona circulante pode afetar a síntese de outro hormônio, a testosterona. A supressão da produção de testosterona pode estar relacionada a ação dos glicocorticoides através da ligação a receptores no hipotálamo, que diminui a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Isso faz com que ocorra diminuição, pela hipófise, da liberação do hormônio luteinizante (LH) e também do hormônio folículo estimulante (FSH) (Dubey and Plant 1985; Kamel and Kubajak 1987; Ulrich-Lai and Herman 2009). Entretanto, nem sempre são encontradas alterações dos níveis de LH e FSH após sucessivas sessões de estresse (Almeida, Petenusci et al. 1998; Nordkap, Jensen et al. 2016). Outro mecanismo envolvido com a supressão da testosterona é através da ação direta dos glicocorticoides, também via receptores, localizados nas células de Leydig, afetando então sua capacidade esteroidogênica, seja através do bloqueio dos receptores responsivos ao LH, ou através de alterações moleculares que afetam as enzimas esteroidogênicas responsáveis pela biossíntese da testosterona (Charpenet, Tache et al. 1982; Lin, Yuan et al. 2014). Outro fator envolvido está relacionado à indução da apoptose das células de Leydig, que naturalmente leva à diminuição da síntese de testosterona (Whirledge and Cidlowski 2010). Portanto, uma vez que as células de Leydig são responsáveis pela síntese e liberação da testosterona, qualquer agressão a elas pode ter impacto direto sobre a fertilidade. Uma análise ultraestrutural da célula de Leydig de ratos cronicamente estressados mostrou que houve alterações em suas organelas, com a presença de alta condensação da cromatina, dilatação do retículo endoplasmático, inchaço mitocondrial, partículas maiores de lipídios, grande depósito de lipofucsina e aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular (Wang, Wang et al. 2012). Ainda, Wang et al. observaram que embora tenha ocorrido aumento dos níveis de corticosterona com depleção dos níveis de testosterona, não houve alteração do número das células de Leydig. Isto sugere que a redução da capacidade esteroidogênica das células de Leydig pode ser devido a alterações moleculares sem apoptose (Wang, Wang et al. 2012).

Um estudo mostra que ratos após serem estressados por imobilização apresentaram redução de 44% dos níveis séricos de testosterona com comprometimento da espermatogênese,

ocasionando um progressivo decréscimo das células germinativas totais com retardo da maturação das espermátides, seguida por diminuição da concentração espermática (Potemina 2008). Outro fator associado à supressão da função testicular com danos espermátogênicos é o fato das células espermáticas em estágios VII e VIII do ciclo espermátogênico serem altamente sensíveis ao hormônio (Hill, Anway et al. 2004; Mahmoud, Mahmoud et al. 2009). Ainda, a testosterona é essencial para a conversão das espermátides arredondada em espermátides alongadas, para se transformarem em espermatozoides (O'Donnell, McLachlan et al. 1994).

Estudos experimentais em ratos também mostram que o estresse crônico por imobilização por vários períodos de 20, 40, 50 ou 60 dias promove aumento da peroxidação lipídica com diminuição da motilidade, viabilidade e concentração espermáticas e aumento de espermatozoides anormais (Priya and Reddy 2012; Garcia-Diaz, Gomez-Quiroz et al. 2015). Almeida e colaboradores (1998) mostraram que animais pré-púberes imobilizados por seis horas diárias durante 60 dias, portanto, até a idade adulta, também exibiram comprometimento da produção espermática, com diminuição de 16% das espermátides maduras com consequente redução de 32% da concentração espermática por epidídimo.

Associadas às alterações bioquímicas e hormonais vistas anteriormente, estão as mudanças estruturais. A diminuição do diâmetro do túbulo seminífero e da altura do epitélio seminífero foram vistas em ratos adultos depois de seis horas de estresse durante 32 dias (Bitgul, Tekmen et al. 2013). Utilizando uma outra fonte estressora, como exposição crônica à uma condição de hipóxia hipobárica (simulando ambientes em altas altitudes que possuem baixa pressão atmosférica), foram observadas diminuição da altura do epitélio seminífero com diminuição de elementos celulares, vacuolização das células epiteliais e dobramento da membrana basal (Farias, Bustos-Obregon et al. 2005). Estresse térmico a uma temperatura de 43°C por seis dias consecutivos em ratos, revelou sérios danos estruturais nos testículos. Um dia após o término do estresse as células germinativas apresentaram-se separadas umas das outras com subsequente presença de espaços irregulares no epitélio seminífero. Quando analisados 14 dias após houve diminuição bem significativa do diâmetro do túbulo seminífero, sendo que alguns túbulos apresentaram destruição das células da camada germinativa, restando somente as células de Sertoli. Entretanto, estas alterações foram menores depois de 35 dias do último estímulo estressor com regeneração de túbulos apresentando espermátócitos primários, mas com presença ainda de vacuolização e espessamento da membrana basal. Este estudo reforça a hipótese que maiores danos podem se manifestar algum tempo depois do estímulo estressor (no caso, 14 dias depois), mas que períodos maiores de avaliação (35 dias) há progresso na recuperação dessas lesões. Ratos jovens imobilizados por duas horas durante sete dias não

apresentaram alterações quanto ao peso testicular e níveis séricos de testosterona (Yazawa, Sasagawa et al. 1999), enquanto ratos adultos imobilizados por três horas durante 40 dias exibiram redução do peso testicular e da testosterona sérica (Wang, Wang et al. 2012).

O estresse crônico também pode afetar a integridade dos constituintes penianos e alterar sua função. É relatado que homens que possuem uma rotina estressante são mais propensos a falhas na ereção peniana, como já mencionado (Hehemann and Kashanian 2016; Song, Kim et al. 2016). Distúrbios de ansiedade e depressão, condições que comumente são precedidas por eventos estressantes, aumentam o risco de disfunção erétil (Hedon 2003; Sahin, Urkmez et al. 2017). Embora a prevalência de DE aumente com a idade, estudos mostram que homens com menos de 40 anos de idade sofrem cada vez mais de tal disfunção (Papagiannopoulos, Khare et al. 2015). Crianças e jovens também sofrem de estresse, principalmente de origem psicogênica (Tal, Voelzke et al. 2009; Teicher and Samson 2016). Contudo, não há conhecimento se isso pode ter impacto sobre a função sexual na juventude e ou na idade adulta. Em adolescentes, o estresse psicológico é considerado o fator mais preponderante relacionado à disfunção erétil (Tal, Voelzke et al. 2009; Teicher and Samson 2016). Os estudos relacionam fatores de risco orgânicos ou psicogênicos associados à DE, mas considerando esses fatores aplicados no homem adulto. Não há estudos que correlacionem estresse durante a infância a problemas sexuais futuros. Como comentado anteriormente, estudos comprovaram que indivíduos submetidos a fatores estressantes na infância podem comprometer permanentemente a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal aumentando a liberação do CRH.

É bem conhecido que estresse crônico reduz os níveis plasmáticos de testosterona, como já mencionado (de Souza, Silva et al. 2012). A testosterona possui um importante papel na modulação e manutenção das estruturas penianas, como também no mecanismo neuroendócrino e vascular descritos anteriormente (Traish 2009). Alterações estruturais no corpo cavernoso do pênis com redução do músculo liso, aumento de fibrose e disfunções endoteliais e nervosas foram associadas à supressão de testosterona (Traish and Kim 2005; Wang, Xu et al. 2015). Estas alterações são ainda condizentes com as encontradas em situações de DE (Dean and Lue 2005). A testosterona atua por várias vias na manutenção dessas estruturas. Por exemplo, é responsável pela modulação da expressão e liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator importante envolvido no mecanismo de ereção. Estudos mostraram que supressão de testosterona causa diminuição da expressão e produção de VEGF associado ao aumento da disfunção erétil. Quando há reposição de testosterona, entretanto, os níveis de VEGF aumentam e a ereção peniana retorna ao normal (Hwang, Oh et al. 2011). Diminuição da testosterona também compromete a síntese de óxido nítrico (essencial para o relaxamento

do músculo liso sinusoidal a arterial), compromete estruturalmente o nervo cavernoso, e reduz a atividade da enzima fosfodiesterase tipo 5 responsável pela detumescência peniana (Traish, Goldstein et al. 2007).

Portanto, alterações metabólicas e hormonais provocadas pelo estresse estão relacionadas a alterações estruturais condizentes à DE. Entretanto, mesmo diante dessas informações, há somente um estudo experimental em ratos que avaliou os efeitos do estresse crônico sobre às estruturas cavernosas penianas (de Souza, Silva et al. 2012). Neste estudo, observaram que o estresse crônico diminuiu o músculo liso sinusoidal e aumentou o depósito de matriz extracelular associado à diminuição sérica de testosterona, reforçando o potencial efeito deletério que o estresse crônico tem sobre às estruturas penianas.

Contudo, ainda não se tem conhecimento se o estresse por imobilização provocado de maneira crônica possui o mesmo efeito quando aplicado em idade diferentes, antes ou após a puberdade. Também, não se conhece se as possíveis lesões testiculares, espermáticas e penianas, mais especificamente do corpo cavernoso, são permanentes ou se há recuperação após o término do estímulo estressor.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos do estresse crônico em testículos e pênis de ratos adultos submetidos ao estresse crônico por imobilização antes e após a puberdade, e avaliar se qualquer alteração pode ser revertida quando o estresse é encerrado.

2.2 Específicos

- Estudar as alterações estruturais nos testículos de ratos pré-púberes e adultos submetidos ao estresse crônico.
- Estudar as variáveis espermáticas e a concentração sérica de testosterona de ratos pré-púberes e adultos submetidos ao estresse crônico.
- Estudar as alterações estruturais nos pênis de ratos pré-púberes e adultos submetidos ao estresse crônico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

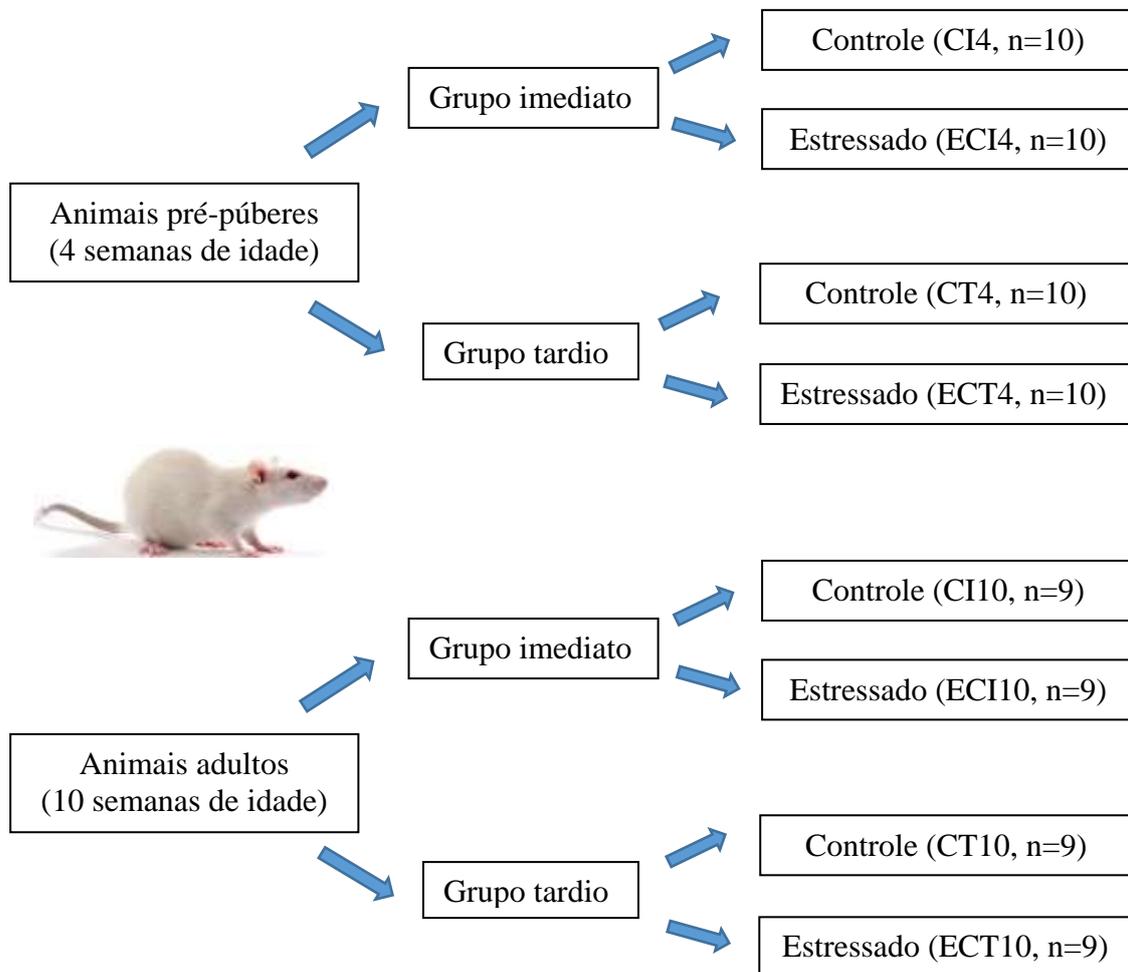
3.1 Animais

Setenta e seis ratos Wistar foram utilizados em todo o experimento. Todos esses animais foram mantidos em gaiolas em biotério com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo artificial de claro-escuro (as luzes ficavam acesas das 7 horas da manhã a 7 horas da noite) e recebiam alimentação padrão e água *ad libitum*. Todo o experimento foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, protocolado sob o número CEUA/004/2015 (Anexo 1).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos de acordo com a idade e com o tipo de avaliação. Foram utilizados animais pré-púberes (4 semanas de idade) e animais adultos (10 semanas de idade). Estes animais foram avaliados ou de forma imediata (24 horas após o último estímulo estressor) ou de forma tardia (6 semanas após o último estímulo estressor). Ainda, estes grupos foram divididos em 4 grupos controles e 4 grupos estressados. Sendo assim, a divisão dos grupos ficou da seguinte forma:

- Grupos controles: CI4 (animais pré-púberes avaliados de forma imediata, n=10); CT4 (animais pré-púberes avaliados de forma tardia n=10); CI10 (animais adultos avaliados de forma imediata, n=9) e CT10 (animais adultos avaliados de forma tardia, n=9).
- Grupos estressados: ECI4 (animais pré-púberes avaliados de forma imediata, n=10); ECT4 (animais pré-púberes avaliados de forma tardia, n=10); ECI10 (animais adultos avaliados de forma imediata, n=9) e ECT10 (animais adultos avaliados de forma tardia, n=9) (Figura 3).

Figura 3. Diagrama da divisão dos grupos experimentais.



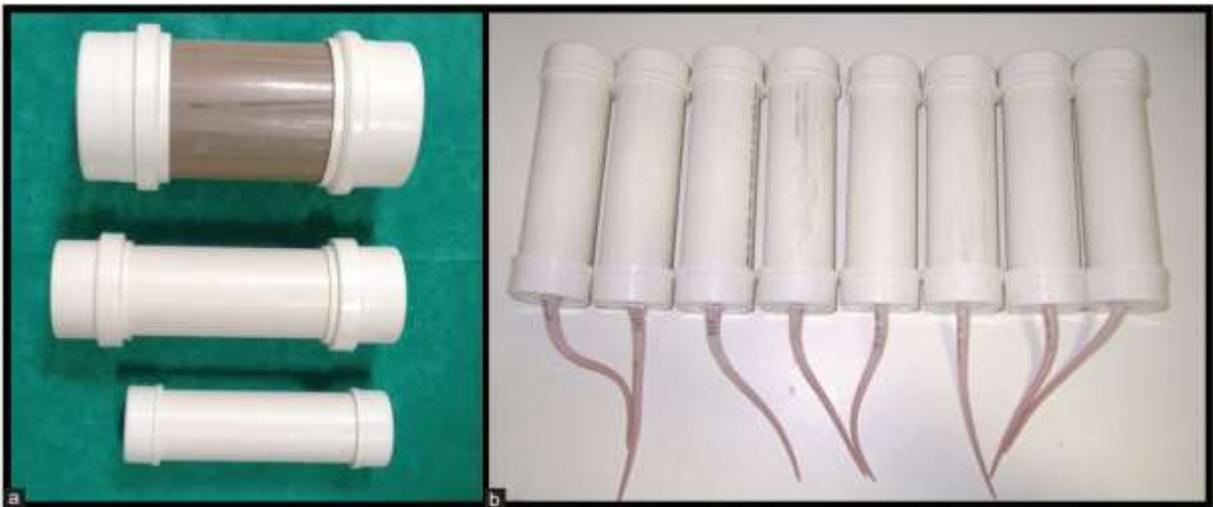
3.2 Estresse crônico

Os animais que foram submetidos ao estresse crônico (ECI4, ECT4, ECI10, ECT10) ficaram restritos à movimentação em tubos de plástico rígido opaco, por duas horas diárias durante 6 semanas, sempre no período da manhã. Os tubos foram fechados em suas extremidades, mas estas, no entanto, tinham pequenas perfurações na extremidade anterior onde ficava a cabeça do animal (para oxigenação), e um furo central na extremidade posterior para permitir a passagem da cauda do animal (Figura 4) (de Souza, Silva et al. 2012). Estes tubos foram ajustados semanal ou quinzenalmente conforme o tamanho do animal. Os animais dos grupos ECI4 e ECI10 foram submetidos ao estresse crônico a partir de 4 e 10 semanas de idade, respectivamente. Após 6 semanas de estresse crônico, quando tinham 10 e 16 semanas de

idades, respectivamente, os animais foram mortos na manhã seguinte à última sessão de estresse (24 horas após o último estímulo estressor), sendo portanto, os grupos de avaliação imediata. Os animais dos grupos ECT4 e ECT10 foram submetidos ao mesmo tratamento de estresse por igual período, no entanto, foram mortos 6 semanas após a última sessão de estresse crônico (grupos de avaliação tardia). Estes animais tinham 16 e 22 semanas de idade, respectivamente, quando então foram mortos.

Já os animais dos grupos controles (CI4, CT4, CI10 e CT10) foram mantidos livres em suas gaiolas pelo mesmo período em que os animais dos grupos estresse crônico ficaram submetidos ao estresse. No entanto, permaneceram sem alimentação e sem água para observar se uma possível perda de peso dos animais estressados não tenha sido por falta de alimentação. Estes foram mortos com idades correspondentes aos dos grupos estressados.

Figura 4. Imagens dos tubos utilizados para a indução do estresse crônico.



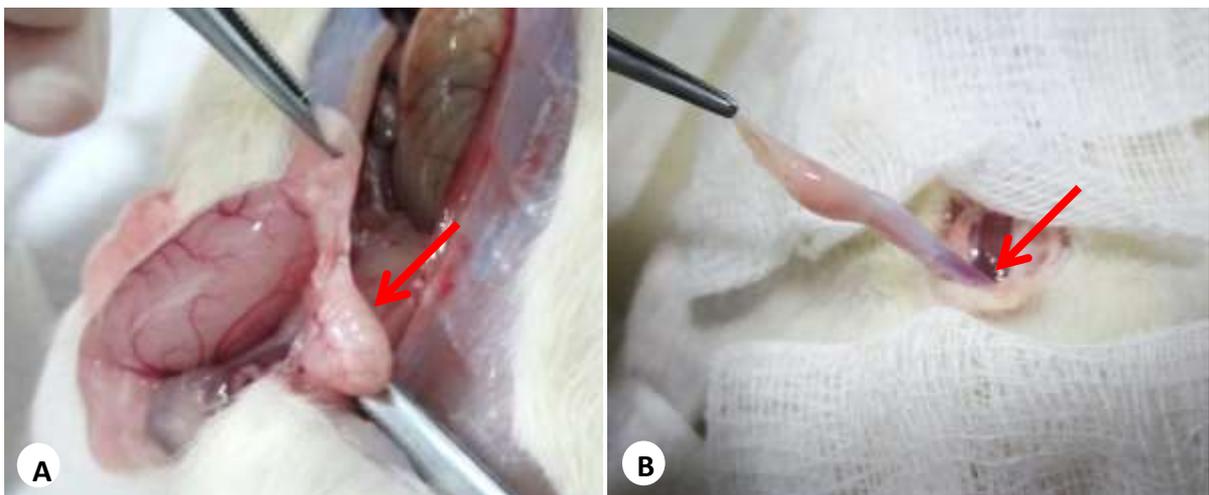
Legenda: Restrição dos animais nos tubos para a indução do estresse crônico por imobilização. (a) Diferentes tamanhos e diâmetros dos túbulos utilizados para a imobilização dos animais. (b) Animais imobilizados dentro dos tubos.

Fonte: A autora, 2015.

3.3 Eutanásia e coleta do material

Todos os animais foram mortos com sobredose de anestésico inalatório, isoflurano a 2% (Forane, Abbott Laboratories, Buenos Aires, Argentina). Para tal, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de acrílico acoplada ao aparelho de anestesia inalatória modelo Colibri (Brasmed, Paulínia, SP, Brasil). O gás anestésico foi liberado para a câmara e, assim que o animal entrou em plano anestésico profundo, foi retirado para o procedimento de coleta do sangue. Foram coletadas amostras de aproximadamente 5 ml de sangue de cada animal, por punção cardíaca, mantidas em tubos falcon de 15 ml sem anticoagulante em temperatura ambiente para retração do coágulo. Logo após a coleta do sangue, com o animal já em óbito, foi realizada uma laparotomia mediana total e ambos os testículos foram expostos por tração de seus cordões espermáticos e dissecados de seus anexos (epidídimo e cordão espermático) (Figura 5). O pênis foi coletado por meio de ressecção na base peniana (Figura...). Ambos os órgãos (testículos e pênis), assim que retirados, foram imediatamente fixados como descrito nas seções 2.7.1 e 2.7.2, respectivamente.

Figura 5. Fotografias mostrando a retirada dos testículos e pênis.



Legenda. (A) A foto ilustra o testículo sendo dissecado de um de seus anexos, o epidídimo (seta vermelha). (B) Exposição do pênis para sua retirada. A seta vermelha aponta para a raiz do pênis, local onde foi feita a ressecção.

Fonte: A autora, 2014.

3.4 Avaliações biométricas

Imediatamente após a dissecação dos testículos de seus anexos, estes foram pesados e seus volumes aferidos pelo teste de Scherle (Scherle 1970). Para a realização deste teste, o testículo foi sustentado através do auxílio de um suporte e completamente submerso num recipiente contendo água destilada (densidade=1). Este recipiente ficava sobre uma balança e o valor fornecido em gramas, provocado pelo deslocamento da água quando o testículo foi submerso, correspondeu ao volume do órgão. Portanto, o valor registrado em gramas na balança foi convertido para mililitros. Importante salientar que o órgão quando foi submerso não tocou nas paredes e no fundo do recipiente.

3.5 Avaliações dos espermatozoides

Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo direito de todos os animais. A cauda do epidídimo foi seccionada em cinco fragmentos e estes foram homogeneizados em 5 ml de solução tampão fosfato-salino (PBS) (Apêndice A) com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) (A9647, Albumin from bovine serum, Sigma, Frederick, Estados Unidos) aquecida à 37°C (Figura 6). Esta solução homogeneizada foi denominada de solução espermática. Desta, foi retirada uma alíquota de 10 µl que foi diluída em microtubos contendo solução de PBS/BSA 0,5% aquecida à 37°C, na proporção de 1:3 ou 1:4 dependendo da turbidez da solução espermática. Esta diluição foi utilizada para a avaliação da concentração. Foram instilados 10 µl desta diluição na câmara de Neubauer espelhada aquecida a 37°C, coberta com lamínula, para então serem analisados sob aumento de 100x. Uma câmera digital (scA780-54gm; Basler, Ahrensburg, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz (eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japão) foi utilizada para captura de vídeos que foram utilizados para as análises da concentração e motilidade espermáticas (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

Figura 6. Fotografia da fragmentação da cauda do epidídimo.



Legenda. A foto ilustra como foi realizada a fragmentação da cauda do epidídimo para a retirada dos espermatozoides que foram homogeneizados na solução espermática.

Fonte: A autora, 2014.

3.5.1 Concentração e motilidade dos espermatozoides

Para a quantificação da concentração dos espermatozoides, foram capturados vídeos de cinco quadrantes da câmara de Neubauer. Posteriormente, nestes arquivos de vídeo, os espermatozoides foram contados e a concentração final foi determinada considerando o fator de diluição utilizado para a obtenção dos espermatozoides e as dimensões dos quadrantes da câmara de Neubauer. Cada quadrante da câmara de Neubauer é composto por 16 quadrantes menores. Estes possuem uma área de $0,0025 \text{ mm}^2$ e $0,1 \text{ mm}$ de altura. Logo, o volume de espermatozoides quantificado é de $0,02 \text{ mm}^3$, que corresponde a $0,00002 \text{ mL}$. Deste modo, este cálculo é corrigido para a quantidade de espermatozoides presente em 1 mL , com o fator de correção de 50000. Com base nesse fator de correção, devem ser inseridos no cálculo o fator de diluição e o número de espermatozoides contados. A concentração final então é expressa em número de espermatozoides $\times 10^6/\text{mL}$.

Já a motilidade espermática foi determinada nas mesmas imagens dos vídeos gravados. Para tal, foram quantificadas células imóveis e o valor encontrado foi subtraído do número total

de espermatozoides em cada campo. O resultado dessa subtração foi dividido pelo número total de espermatozoides e multiplicado por 100 para determinação do percentual de espermatozoides móveis (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

3.5.2 Viabilidade dos espermatozoides

Para a avaliação da viabilidade dos espermatozoides foi realizado o teste hipo-osmótico. A solução espermática foi diluída na proporção de 1:4 em uma solução aquosa contendo citrato de sódio a 0,735% e frutose a 1,351% de modo que esta solução tenha uma osmolaridade de 100 mOsm/L, ou seja, menor do que a osmolaridade do meio intracelular, portanto considerada hipo-osmótica. Esta diluição foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após este período, 10 µl desta solução foi depositada em lâmina coberta com lamínula para observação em microscopia de luz sob aumento de 200x com uso do microscópio BH-2 (Olympus, Tóquio, Japão). As células que apresentaram dobramento de cauda foram consideradas viáveis. A viabilidade foi determinada então como a porcentagem de células viáveis sobre o total de células quantificadas. Para esta análise, 200 espermatozoides foram avaliados por amostra de cauda do epidídimo por animal (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

3.6 Testosterona sérica

Após a coleta do sangue, conforme mencionada na seção 2.3, o soro foi então separado por centrifugação a 2260 força centrífuga relativa (FCR x g) por cinco minutos em centrífuga Excelsa® II modelo 206 BL (Fanem, São Paulo, Brasil). O soro foi transferido para microtubos e estes mantidos à -20°C até a análise. A concentração sérica de testosterona foi mensurada pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Cat. ADI-900-065, Enzo, New York, NY, USA; sensibilidade de 5,67 pg/ml) (Lu, Mei et al. 2015) (Apêndice B).

3.7 Análises histomorfométricas

3.7.1 Testículos

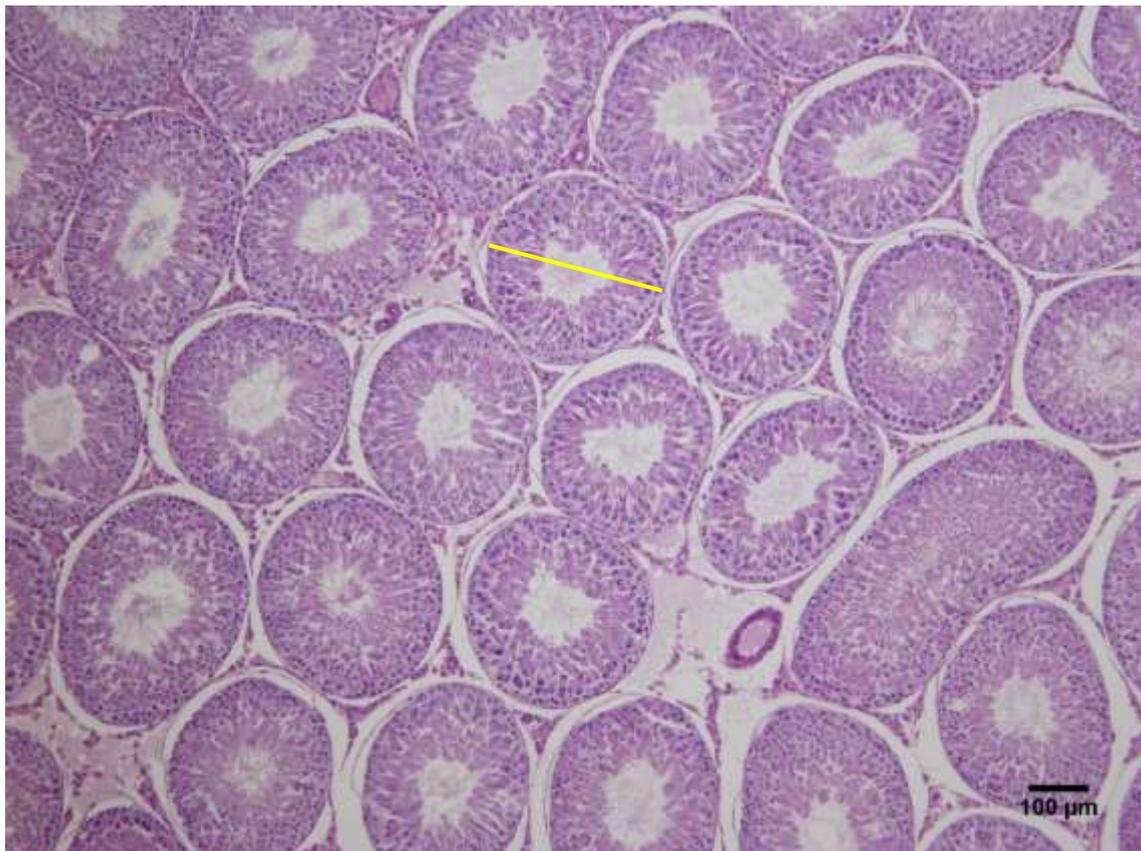
O testículo direito de todos os animais foi utilizado para as avaliações morfométricas. Após sua pesagem, a extremidade *capitata*, que corresponde a porção proximal do órgão, foi clivada para permitir que o agente fixador penetrasse no parênquima testicular. O testículo então foi fixado por imersão em solução de Bouin durante 24 horas. Após este período, o órgão foi clivado transversalmente em cinco fragmentos, dos quais os fragmentos das extremidades foram desprezados. Os três fragmentos remanescentes foram imersos em formaldeído a 3,7% em tampão fosfato (pH 7,4) para pós fixação. Os fragmentos fixados foram colocados em cassetes histológicos identificados e processados automaticamente para inclusão em parafina através do processador de tecidos de bancada semifechado modelo TP1020 (Leica, Wetzlar, Alemanha). De maneira sucinta, estes fragmentos foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol (70% - 100%), diafinizados em xilol e embebidos em parafina aquecida à 60°C. Logo após essa etapa, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina com a utilização da máquina de inclusão modelo EG1150H (Leica, Wetzlar, Alemanha), à temperatura de 60°C e endurecidos em temperatura ambiente. A partir destes blocos parafinados, foram obtidos cortes histológicos não seriado de 5 µm de espessura em equipamento rotativo modelo 2125RT (Leica, Wetzlar, Alemanha).

Para as análises morfométricas, os cortes coletados em lâminas histológicas convencionais foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E) (Apêndice B). Estes foram fotografados, de maneira aleatória, sob diferentes aumentos (de acordo com a análise que será comentada a seguir), pela câmera DP71 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando o programa DP Controller (3.3.1.292, Olympus, Tóquio, Japão). As imagens capturadas foram analisadas utilizando o programa ImageJ versão 1.47t (NIH, Bethesda, Estados Unidos). Para as análises expressas em valores absolutos, o programa foi formatado para conversão de unidades de pixel para micrômetros pela calibração utilizando uma régua histológica micrometrada. Esta foi fotografada sob as mesmas condições (câmera, microscópio, objetiva e resolução) dos cortes analisados. Todas as fotomicrografias foram capturadas com resolução de 2040x1536 (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

3.7.1.1 Diâmetro do túbulo seminífero

O diâmetro de 125 túbulos seminíferos por animal (5 túbulos em 5 campos de 5 cortes) foi mensurado. Foram mensurados túbulos seminíferos considerando para a análise apenas túbulos de contorno circular. Para esta análise, foram utilizadas fotomicrografias capturadas em aumento de 100x. Para tal, foi traçada uma linha reta utilizando a ferramenta “straight line” do software ImageJ. Esta linha se estendia da túnica própria de um polo ao outro do túbulo passando pelo centro do mesmo (Figura 7). O resultado da análise de cada testículo foi a média dos 125 diâmetros mensurados, expresso em μm (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

Figura 7. Fotomicrografia do corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.

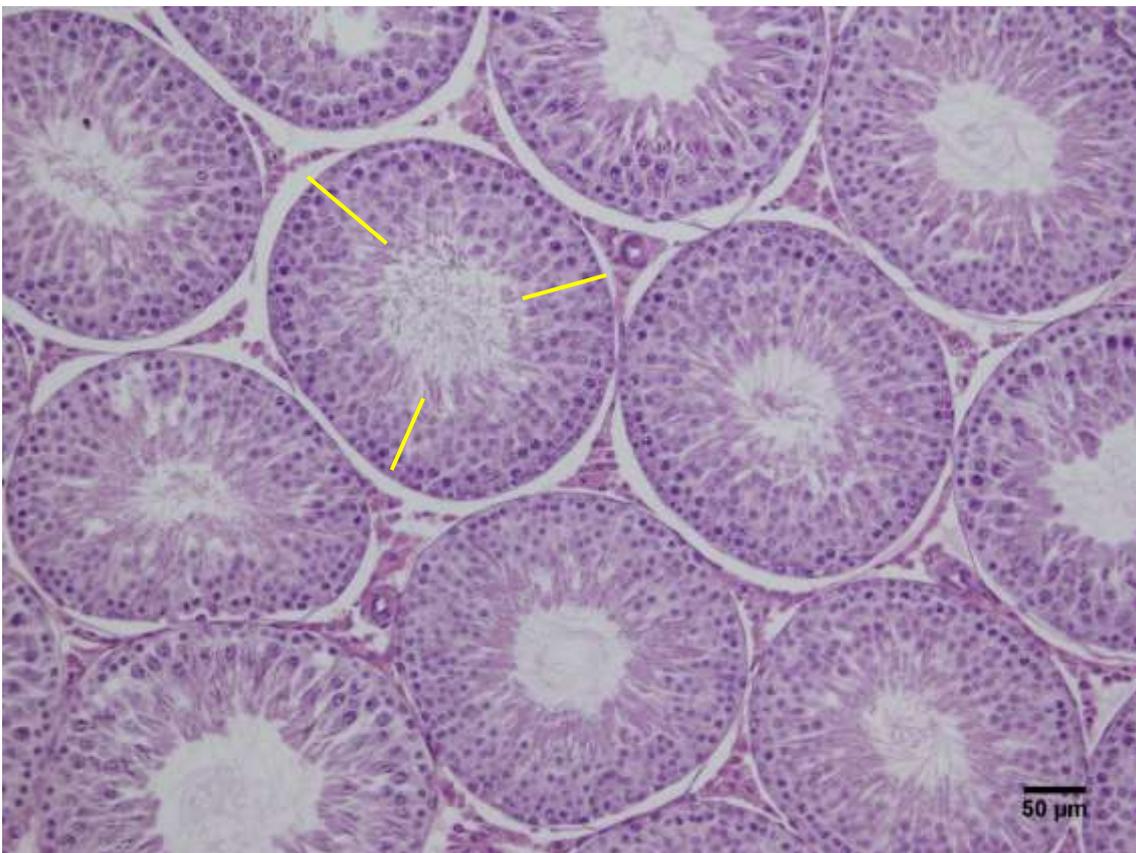


Legenda: A linha reta amarela mostra o traçado para a mensuração do diâmetro em um dos túbulos seminíferos. H&E, 100x.
Fonte: RIBEIRO, 2015

3.7.1.2 Altura do epitélio seminífero

Para a análise deste parâmetro foram traçadas três linhas (utilizando a mesma ferramenta usada para o diâmetro) que se estendem a partir das células aderidas à túnica própria (células de Sertoli e espermatogônias) até a célula mais interna em direção ao lúmen do túbulo seminífero (espermátides). Não consideramos os espermatozoides como células integrantes do epitélio seminífero. As três linhas foram distribuídas de forma equidistantes uma da outra como ilustrado na figura 6. A média destas três linhas foi considerada como a altura do epitélio daquele túbulo seminífero analisado (Figura 8). Para esta análise, foram utilizadas fotomicrografias em aumento de 200x. Novamente, 125 túbulos seminíferos foram mensurados por animal. O resultado da análise de cada testículo foi considerado a média dos 125 túbulos mensurados, expresso em μm (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

Figura 8. Fotomicrografia do corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.



Legenda: As três linhas retas amarelas mostram o traçado e a disposição para a mensuração da altura do epitélio seminífero em um dos túbulos seminíferos. H&E, 200x.

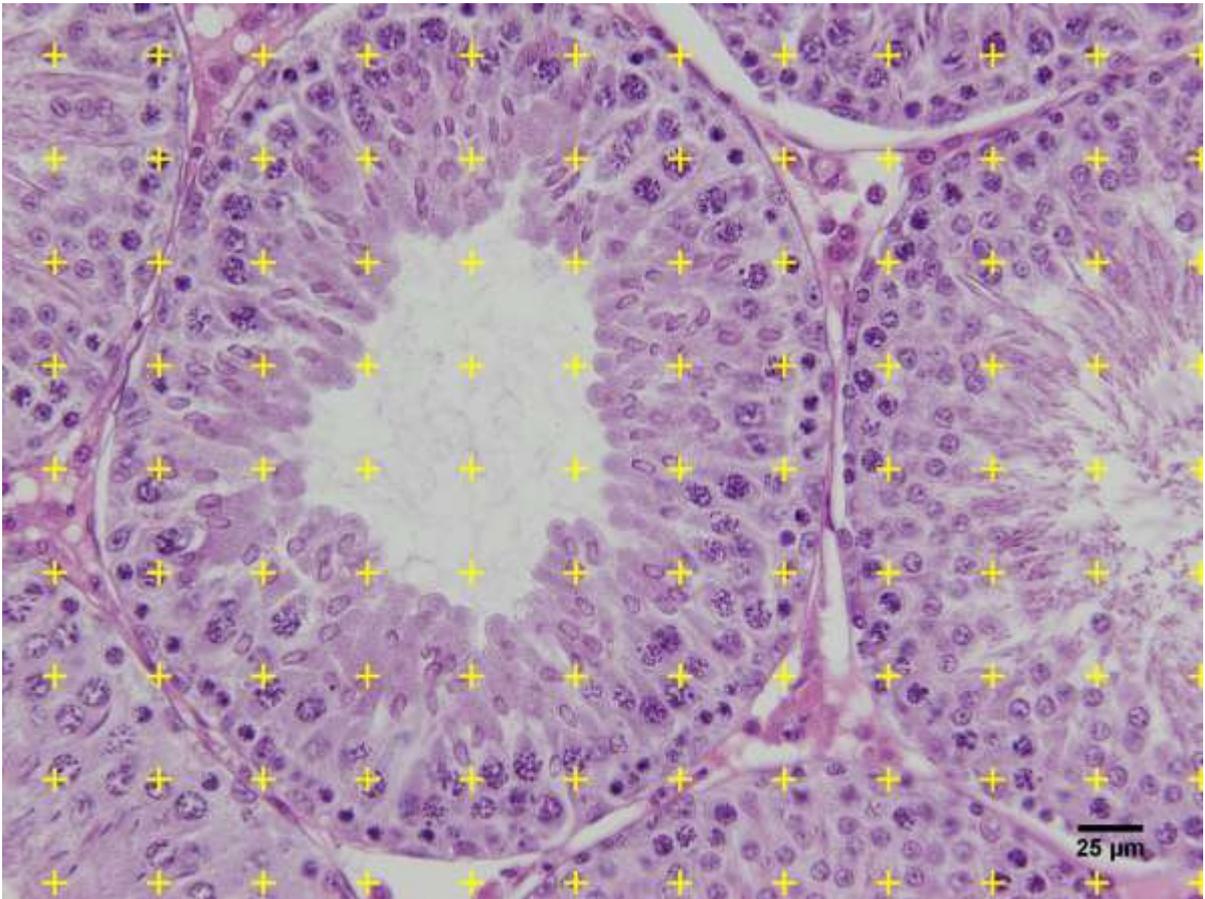
Fonte: RIBEIRO, 2015.

3.7.1.3 Densidade volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular

Tais parâmetros foram avaliados pela técnica de contagem de pontos através da sobreposição de uma grade de 99 pontos às fotomicrografias dos testículos, utilizando-se a ferramenta “grid” do programa ImageJ (Figura 9). No entanto, para sobrepor a grade, foi necessário mensurar antes a área da imagem através da ferramenta “Analyze” → “measure”. O valor da área encontrado foi utilizado para a distribuição dos pontos. No entanto, a ferramenta “grid” dispõe de alguns formatos sendo o utilizado neste estudo o formato em cruz, como ilustrado na figura 7. Para a contagem, foi considerado o quadrante superior direito da cada cruz. Com o auxílio da ferramenta “cell counter” foram contadas as seguintes estruturas que incidiam sobre os quadrantes: túnica própria, epitélio seminífero, lúmen tubular e espaço intersticial. A contagem dos pontos que incidiam sobre cada uma destas estruturas foi dividida pelo número total de pontos e multiplicado por 100 para então expressar os resultados em porcentagem. O somatório das densidades volumétricas da túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular foi considerado como a densidade volumétrica do túbulo seminífero (compartimento tubular). A densidade volumétrica do espaço intersticial foi considerada como a do compartimento intertubular.

Foram analisadas 25 fotomicrografias aleatoriamente capturadas (5 campos de 5 cortes). Para cada parâmetro o resultado foi expresso em porcentagem e calculado pela média dos resultados de cada imagem analisada. Para esta análise, foram utilizadas imagens capturadas em aumento de 400x (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

Figura 9. Fotomicrografia do corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.



Legenda: Sobreposição da grade em cruz à imagem para quantificação das densidades estruturais do compartimento tubular e intertubular. H&E, 400x.
Fonte: Ribeiro, 2015.

3.7.1.4 Volume absoluto dos compartimentos tubular e intertubular

O volume de cada estrutura analisado foi calculado com base na sua densidade volumétrica e no volume do testículo (Ribeiro, Milhomem et al. 2014), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de Y} = (V_v [Y] / 100) \times \text{volume testicular}$$

V_v: densidade volumétrica

Onde Y é a estrutura analisada.

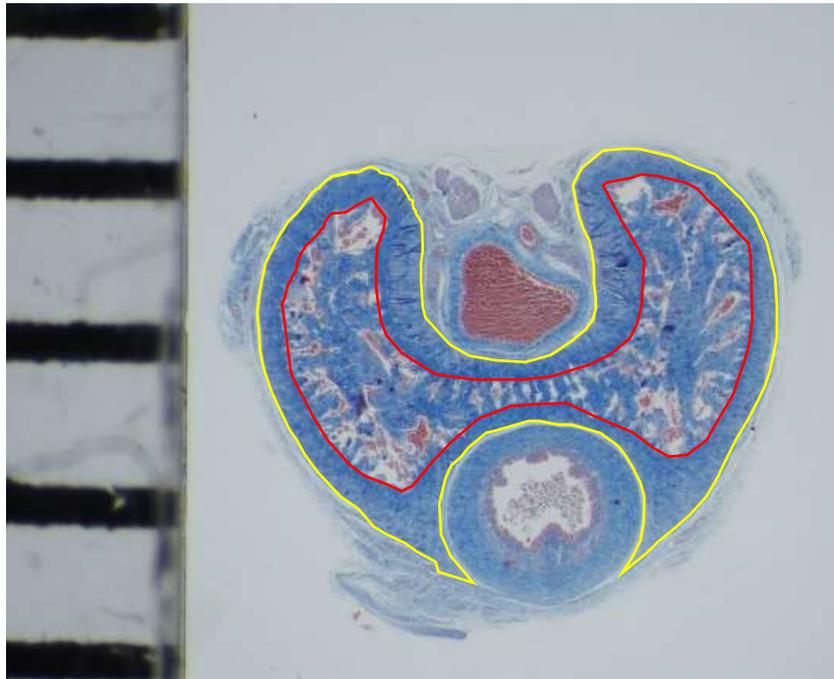
3.7.2 Pênis

Imediatamente após a retirada do pênis, ele foi fixado por imersão em formaldeído à 3,7% e mantido no fixador por um período máximo de 48 h. Após esse período, foi realizada a secção transversal da porção média do pênis a qual foi utilizada para as análises. Este fragmento foi processado da mesma forma como descrito para os testículos até a inclusão em parafina. Também foram obtidos cortes de 5 µm de espessura de forma não seriada.

3.7.2.1 Avaliação das áreas do corpo cavernoso (com e sem túnica albugínea) e da área da túnica albugínea

Os cortes obtidos foram corados em Tricrômico de Masson (Apêndice B) para a avaliação da área do corpo cavernoso (com e sem túnica albugínea) e da área da túnica albugínea. Para estas análises, as imagens foram capturadas em estereomicroscópio (Stereo Discovery.V8, Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado à câmera digital Axiocam 506 color (Zeiss, Alemanha) em aumento de 12x. Estes cortes foram capturados juntos à uma régua graduada para calibração do programa de análise. Com auxílio do programa ImageJ, foram analisados 5 cortes por animal da seguinte forma: para avaliação da área do corpo cavernoso com túnica albugínea, foi utilizada a ferramenta “free hand”, sendo esta contornada por toda superfície externa da túnica albugínea. Já para a mensuração da área do corpo cavernoso sem túnica albugínea, a mesma ferramenta foi utilizada contornando-se a superfície interna da túnica albugínea. A mensuração da área da túnica albugínea foi obtida pela diferença entre a área do corpo cavernoso com túnica albugínea à área do corpo cavernoso sem túnica albugínea (Figura 10). Os resultados foram dados em mm².

Figura 10. Fotomicrografia do corte transversal da porção média do pênis de rato.

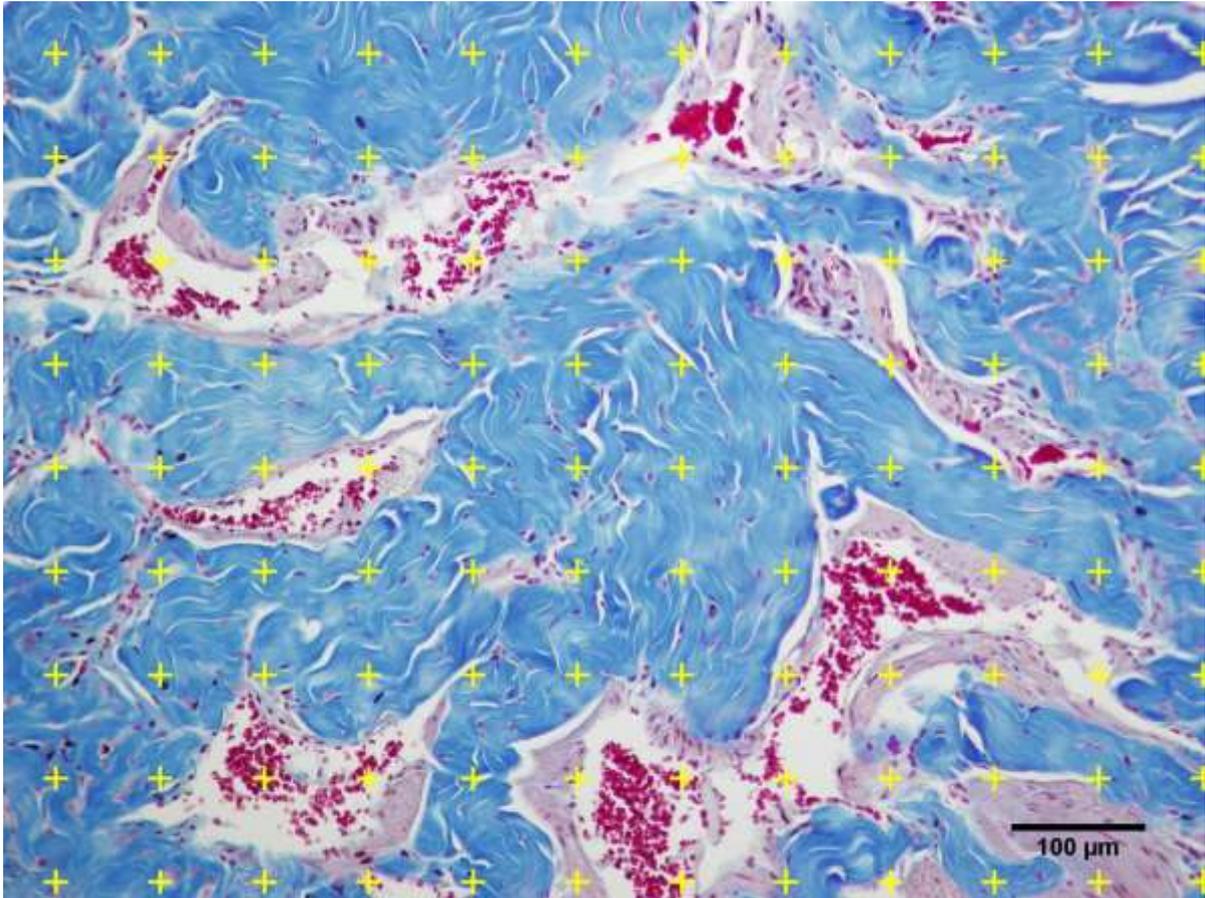


Legenda: A imagem ilustra as aferições das áreas do corpo cavernoso com túnica albugínea (contorno em amarelo) e sem túnica albugínea (contorno em vermelho). Tricrômico de Masson, 12x.
Fonte: Ribeiro, 2016.

3.7.2.2 Densidade das estruturas do corpo cavernoso

Nos mesmos cortes mencionados na seção anterior foi avaliada a densidade das seguintes estruturas do corpo cavernoso: músculo liso, tecido conjuntivo e espaço sinusoidal em fotomicrografias capturadas em microscópio de luz (BX51, Olympus, Tokyo, Japão) acoplado à câmera digital (DP70, Olympus, Tokyo, Japão) em aumento de 200x (de Souza, Silva et al. 2012). Foram quantificadas fibras do sistema elástico em cortes corados pela solução de fucsina resorcina de Weigert com prévia oxidação (Apêndice B), capturadas em aumento de 600x. Foram analisadas 25 imagens de cada animal para a avaliação das densidades das estruturas cavernosas (músculo liso, tecido conjuntivo e espaço sinusoidal) utilizando a mesma metodologia adotado nos testículos, como já mencionado (Figura 11). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Figura 11. Fotomicrografia do corte transversal do corpo cavernoso do pênis de rato.



Legenda: A imagem mostra a sobreposição da grade em cruz (amarelo) sobre as estruturas cavernosas do pênis. Tricrômio de Masson, 200x.
Fonte: Ribeiro, 2016.

3.8 Análise estatística

Os dados foram tabulados e as médias dos grupos foram comparadas pelo teste T de Student. Foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados eram paramétricos ou não. Os resultados foram comparados entre os grupos controle e estressado, de mesma idade e de mesmo tempo de análise, imediata ou tardia. Para tal foi utilizado o programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos imediatos do estresse crônico em ratos pré-púberes

4.1.1 Análises Biométricas

A avaliação do peso corporal final dos animais mostrou que houve diminuição de 14% nos ratos do grupo ECI4 quando comparado ao grupo CI4 ($177 \pm 15,8$ g vs. $206 \pm 11,0$ g; $p < 0,01$). Nenhuma alteração foi observada no peso ($1,70 \pm 0,15$ g vs. $1,75 \pm 0,15$ g; $p = 0,31$) e no volume dos testículos ($1,75 \pm 0,16$ ml vs. $1,78 \pm 0,15$ ml; $p = 0,51$) no grupo ECI4 comparado ao grupo CI4.

4.1.2 Análises dos espermatozoides e da testosterona sérica

Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação aos parâmetros de concentração ($1,15 \pm 0,80 \times 10^6$ /ml vs. $1,27 \pm 0,70 \times 10^6$ /ml; $p = 0,72$), motilidade ($39,8 \pm 21,7$ % vs. $49,5 \pm 12,5$ %; $p = 0,24$) e viabilidade ($11,0 \pm 2,18$ % vs. $12,0 \pm 4,06$ %; $p = 0,54$) do grupo ECI4 quando comparado ao grupo CI4.

Não houve diferença significativa da concentração sérica de testosterona no grupo ECI4 quando comparado ao grupo CI4 ($11,93 \pm 1,21$ ng/ml vs. $13,00 \pm 1,67$ ng/ml; $p = 0,23$).

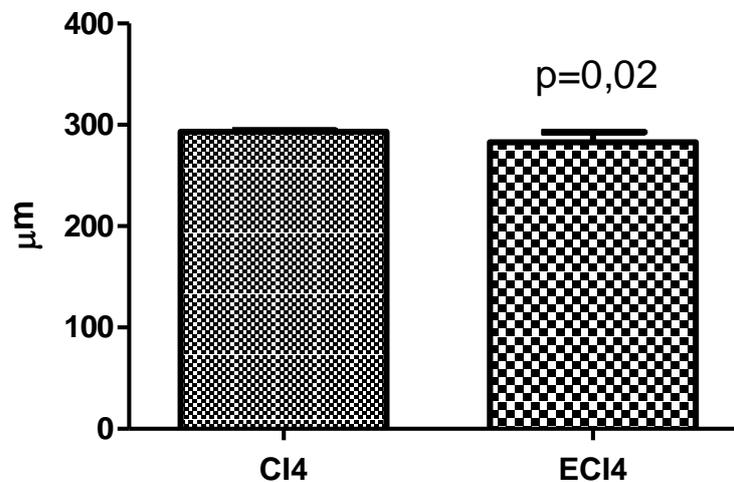
4.1.3 Análises histomorfométricas

Os animais do grupo ECI4 apresentaram uma redução de 4% do diâmetro do túbulo quando comparados ao grupo CI4 ($282 \pm 10,3 \mu\text{m}$ vs. $293 \pm 3,72 \mu\text{m}$; $p=0,02$) (Gráfico 1 e figura 12).

Nenhuma diferença foi encontrada em relação à altura do epitélio seminífero do grupo ECI4 comparado ao grupo CI4 ($53,6 \pm 2,61 \mu\text{m}$ vs. $55,1 \pm 1,10 \mu\text{m}$; $p=0,19$).

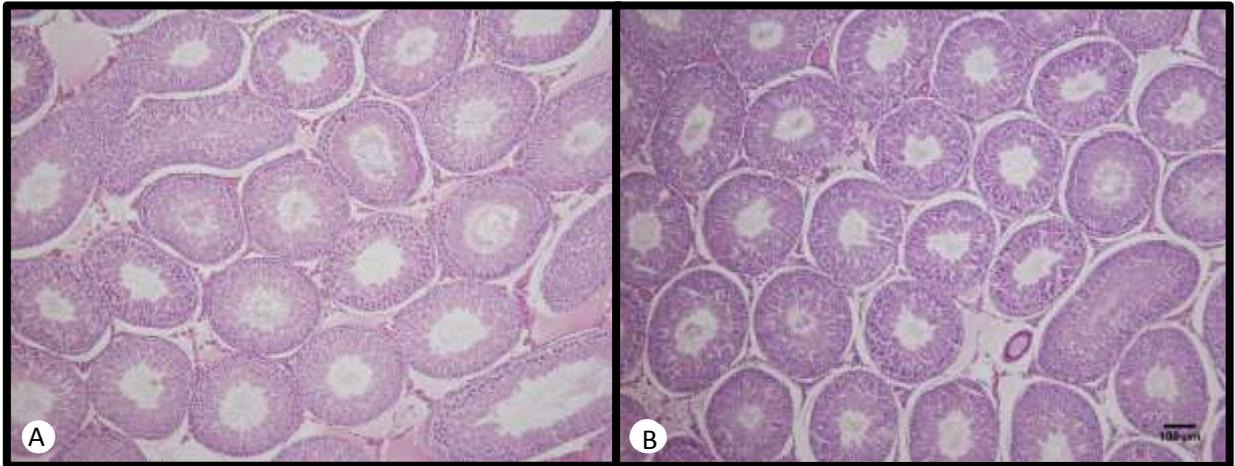
Nenhuma alteração foi observada em relação à densidade volumétrica e ao volume absoluto das diferentes estruturas que compõem os compartimentos tubular e intertubular testiculares. Os dados estatísticos se encontram na tabela 1.

Gráfico 1. Diâmetro do túbulo seminífero.



Legenda: animais do grupo controle (CI4) e animais do grupo estresse pré-púbere de avaliação imediata. (ECI4).
Nota. Dados expressos como média e desvio padrão.
Fonte: A autora, 2015.

Figura 12. Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos pré-púberes de avaliação imediata.



Legenda: Diâmetro do túbulo seminífero dos animais do grupo CI4 (A) e dos animais do grupo ECI4 (B). H&E, 100x

Fonte: A autora. 2015.

No que se refere à análise do corpo cavernoso do pênis, não foram encontradas alterações em nenhum dos parâmetros avaliados: área do corpo cavernoso com túnica albugínea ($5,26 \pm 0,67 \text{ mm}^2$ vs. $5,09 \pm 0,53 \text{ mm}^2$; $p=0,53$); área do corpo cavernoso sem túnica albugínea ($3,12 \pm 0,41 \text{ mm}^2$ vs. $3,07 \pm 0,42 \text{ mm}^2$ ECI4; $p=0,80$) e área da túnica albugínea ($2,14 \pm 0,41 \text{ mm}^2$ vs. $2,02 \pm 0,14 \text{ mm}^2$; $p=0,38$) do pênis após o último estímulo estressor no grupo ECI4 quando comparado ao grupo CI4.

Não foram encontradas diferenças significativas com relação à densidade das estruturas do corpo cavernoso do pênis após o último estímulo estressor no grupo ECI4 comparado ao grupo CI4. Os dados estatísticos se encontram na tabela 1.

Tabela 1. Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CI4) e estressado (ECI4) de ratos pré-púbere de avaliação imediata.

	CI4	ECI4	Valor de p
Testículo			
Epitélio seminífero Vv (%)	54,2 ± 1,35	55,8 ± 4,46	0,37
Volume absoluto epitélio seminífero Av (ml)	0,96 ± 0,11	0,98 ± 0,12	0,74
Túnica própria Vv (%)	3,40 ± 0,47	3,66 ± 0,58	0,37
Volume absoluto túnica própria Av (ml)	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,38
Lúmen tubular Vv (%)	32,2 ± 1,67	30,8 ± 5,33	0,50
Volume absoluto lúmen tubular Av (ml)	0,57 ± 0,05	0,54 ± 0,12	0,61
Compartimento tubular Vv (%)	89,9 ± 1,36	90,3 ± 1,56	0,57
Volume absoluto compartimento tubular Av (ml)	1,59 ± 0,16	1,59 ± 0,17	0,99
Compartimento intertubular Vv (%)	10,0 ± 1,36	9,61 ± 1,56	0,57
Volume absoluto compartimento intertubular Av (ml)	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,59
Pênis			
Músculo liso Vv (%)	9,90 ± 1,95	10,6 ± 2,35	0,42
Tecido conjuntivo Vv (%)	73,7 ± 4,59	72,6 ± 3,57	0,56
Espaço sinusóide Vv (%)	16,3 ± 4,06	16,6 ± 3,12	0,85
Fibras do sistema elástico Vv (%)	0,79 ± 0,40	0,78 ± 0,21	0,96

Dados expressos como média e desvio padrão

Vv – densidade volumétrica

Av – volume absoluto

Fonte: A autora, 2016.

4.2 Efeitos imediatos do estresse crônico em ratos adultos

4.2.1 Análises biométricas

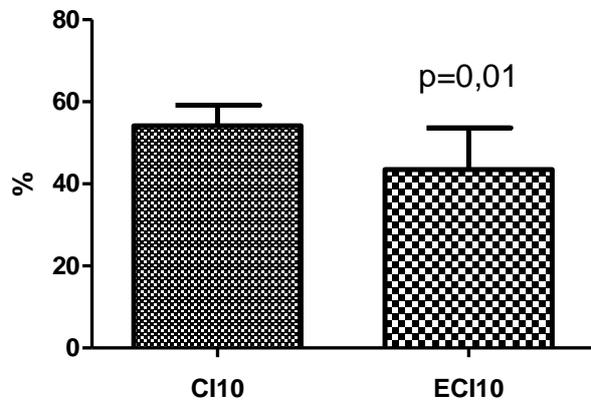
Nenhuma alteração em relação ao peso corporal final dos animais do grupo ECI10 foi encontrada quando comparado ao grupo CI10 ($342 \pm 28,3$ g vs. $353 \pm 32,8$ g; $p=0,86$). Entretanto, nos dados referentes ao peso e volume testiculares, foram encontradas diminuição de 12% ($1,6 \pm 0,2$ g vs. $1,9 \pm 0,2$ g; $p<0,01$) e 10% ($1,6 \pm 0,2$ ml vs. $1,9 \pm 0,2$ ml; $p<0,01$), respectivamente, no grupo ECI10 quando comparado ao grupo CI10.

4.2.2 Análises dos espermatozoides e testosterona sérica

Com relação aos dados dos espermatozoides, houve redução de 19% da motilidade espermática ($43,4 \pm 10,1\%$ vs. $54,1 \pm 5,0\%$; $p=0,01$) e de 46% ($8,8 \pm 2,3\%$ vs. $16,4 \pm 3,6\%$; $p<0,01$) da viabilidade espermática do grupo ECI10 quando comparado ao grupo CI10 (Gráficos 2 e 3). Em relação à concentração espermática nenhuma alteração foi encontrada nos animais do grupo ECI10 comparado ao grupo CI10 ($1,83 \pm 1,51 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $2,21 \pm 1,48 \times 10^6/\text{ml}$; $p=0,59$).

A análise da testosterona sérica mostrou uma redução de 21% no grupo ECI10 comparado ao grupo CI10 ($8,83 \pm 1,53$ ng/ml vs. $11,25 \pm 2,14$ ng/ml, $p=0,04$) (Gráfico 4).

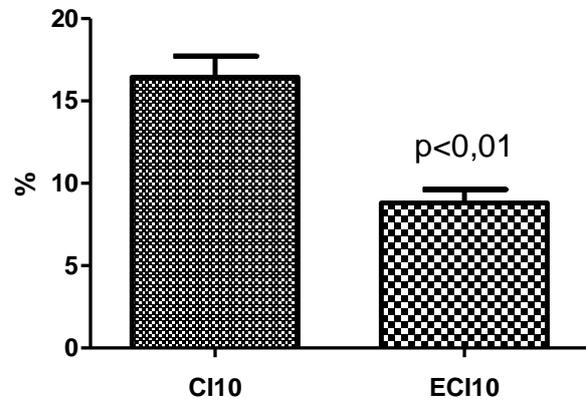
Gráfico 2. Motilidade espermática



Legenda. Grupo controle (CI10) e grupo estresse adulto de avaliação imediata (ECI10).

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.
Fonte: A autora, 2015.

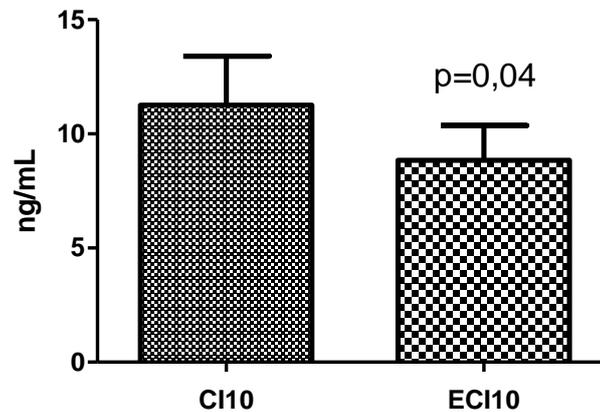
Gráfico 3. Viabilidade espermática



Legenda. Grupo controle (CI10) e grupo estresse adulto de avaliação imediata (ECI10).

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.
Fonte: A autora, 2015.

Gráfico 4. Concentração sérica de testosterona



Legenda. Animais do grupo controle (CI10) e dos animais do grupo estresse adulto de avaliação imediata (ECI10).

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.
Fonte: A autora, 2016.

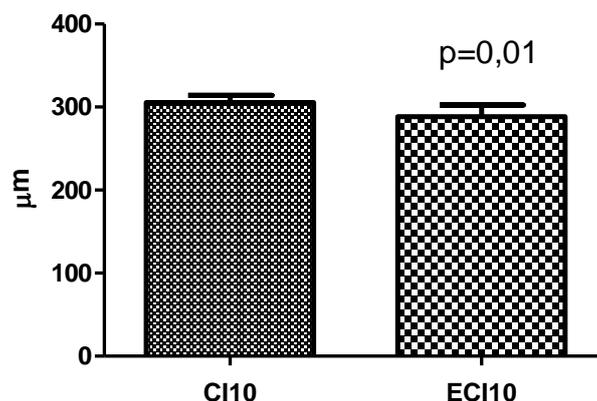
4.2.3 Análises histomorfométricas

Os animais do grupo ECI10 apresentaram uma redução de 6% do diâmetro do túbulo seminífero quando comparado ao grupo CI10 ($288,6 \pm 13,87 \mu\text{m}$ vs. $305,5 \pm 8,70 \mu\text{m}$; $p=0,01$) (Gráfico 5 e figura 13).

Nenhuma diferença foi encontrada em relação à altura do epitélio seminífero nos animais do grupo ECI10 comparado ao grupo CI10 ($51,3 \pm 3,49 \mu\text{m}$ vs. $51,0 \pm 1,60 \mu\text{m}$; $p=0,81$).

Em relação aos dados da densidade volumétrica das estruturas testiculares avaliadas, foi observado um aumento de 9% da densidade do epitélio seminífero no grupo ECI10 comparado ao grupo CI10. Ao analisar o volume absoluto desta estrutura, não foi observada nenhuma alteração no grupo ECI10 comparado ao grupo CI10. A densidade volumétrica do lúmen tubular teve uma redução de 11% no grupo ECI10 comparado ao grupo CI10; o que também foi observado em termos de volume absoluto, porém a redução foi de 17%. A análise do compartimento tubular como um todo, tanto a densidade volumétrica quanto o volume absoluto não apresentaram diferença entre os grupos ECI10 e CI10 (Figura 14). Os dados estatísticos se encontram na tabela 2.

Gráfico 5. Diâmetro do túbulo seminífero

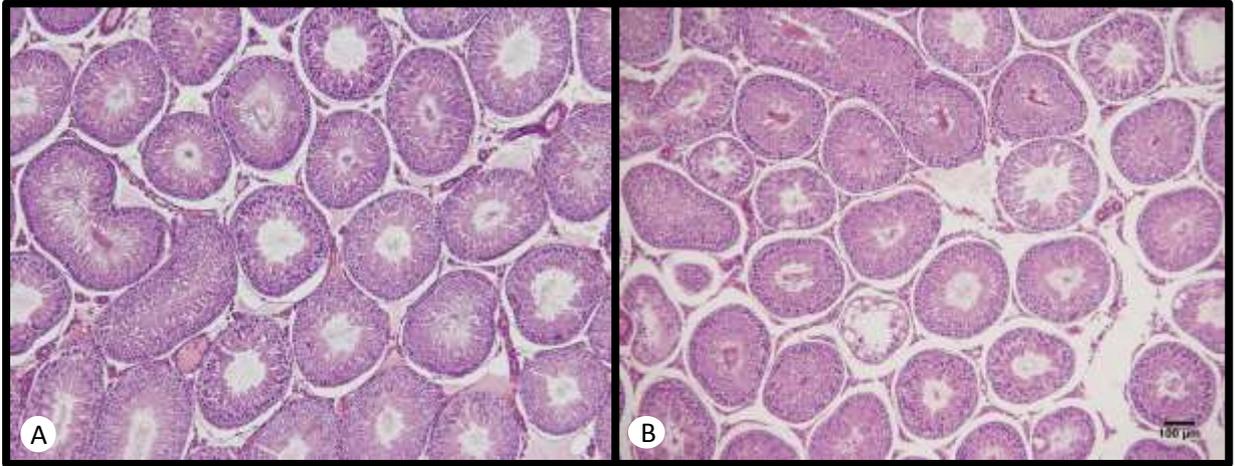


Legenda. Animais do grupo controle (CI10) e animais do grupo estresse adulto de avaliação imediata (ECI10).

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

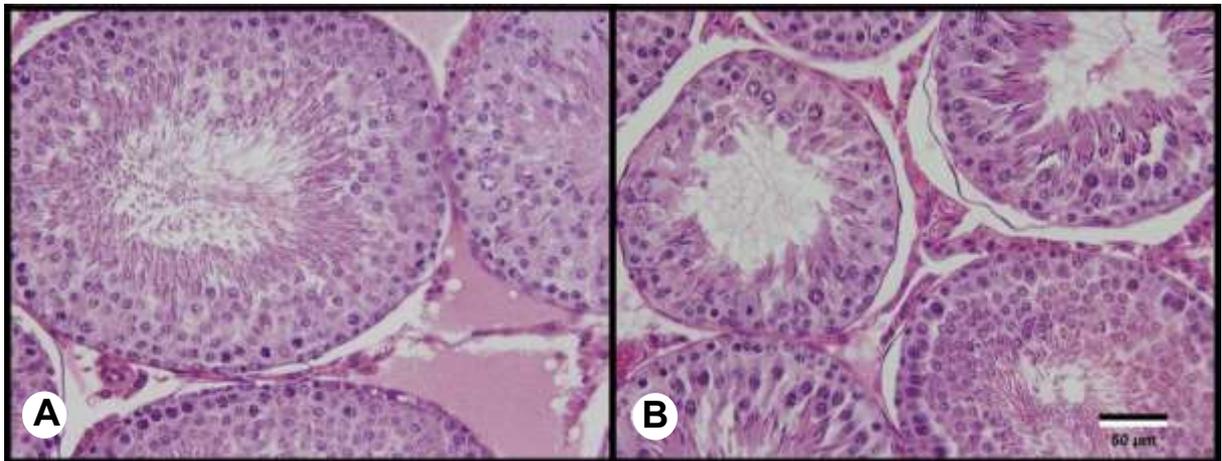
Fonte: A autora, 2015.

Figura 13. Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos adultos de avaliação imediata.



Legenda: Diâmetro do túbulo seminífero dos animais do grupo CI10 (A) e dos animais do grupo ECI10 (B).
H&E, 100x.
Fonte: A autora, 2015.

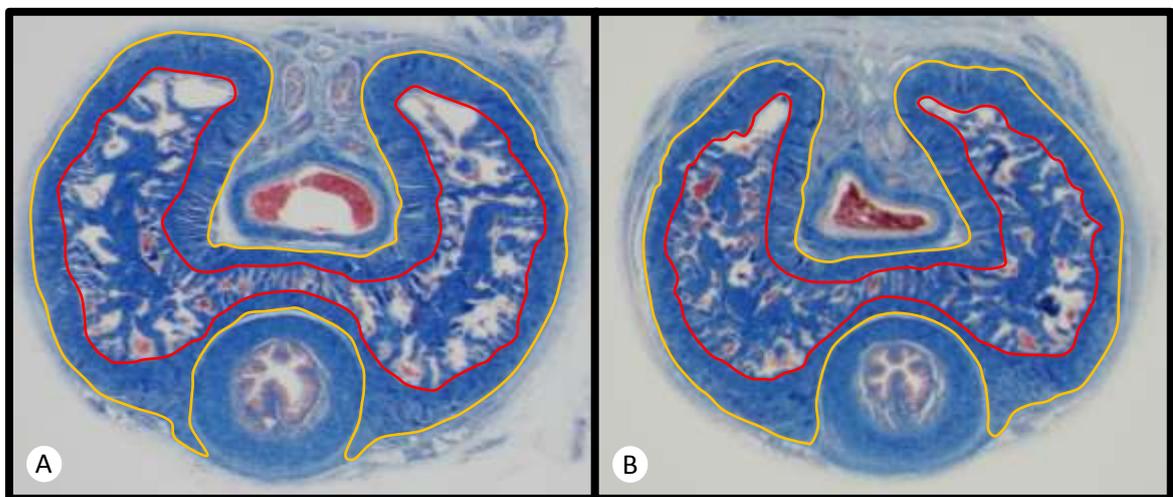
Figura 14. Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos adultos de avaliação imediata.



Legenda: As imagens A e B são dos grupos ECI4 e ECI10, respectivamente. H&E, 400x.
Fonte: A autora, 2017.

No que concerne ao corpo cavernoso do pênis, houve diminuição significativa de 11,5% e $(5,21 \pm 0,71 \text{ mm}^2 \text{ vs. } 5,89 \pm 0,35 \text{ mm}^2; p= 0,02)$ de 16% $(3,05 \pm 0,58 \text{ mm}^2 \text{ vs. } 3,63 \pm 0,28 \text{ mm}^2; p=0,02)$ da área do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea, respectivamente, no grupo ECI10 comparado ao grupo CI10. Nenhuma alteração foi encontrada no que se refere à área da túnica albugínea no grupo ECI10 quando comparado ao grupo CI10 $(2,15 \pm 0,16 \text{ mm}^2 \text{ vs. } 2,26 \pm 0,12 \text{ mm}^2; p=0,16)$ (Figura 15).

Figura 15. Fotomicrografias do corte transversal do pênis dos ratos adultos de avaliação imediata.

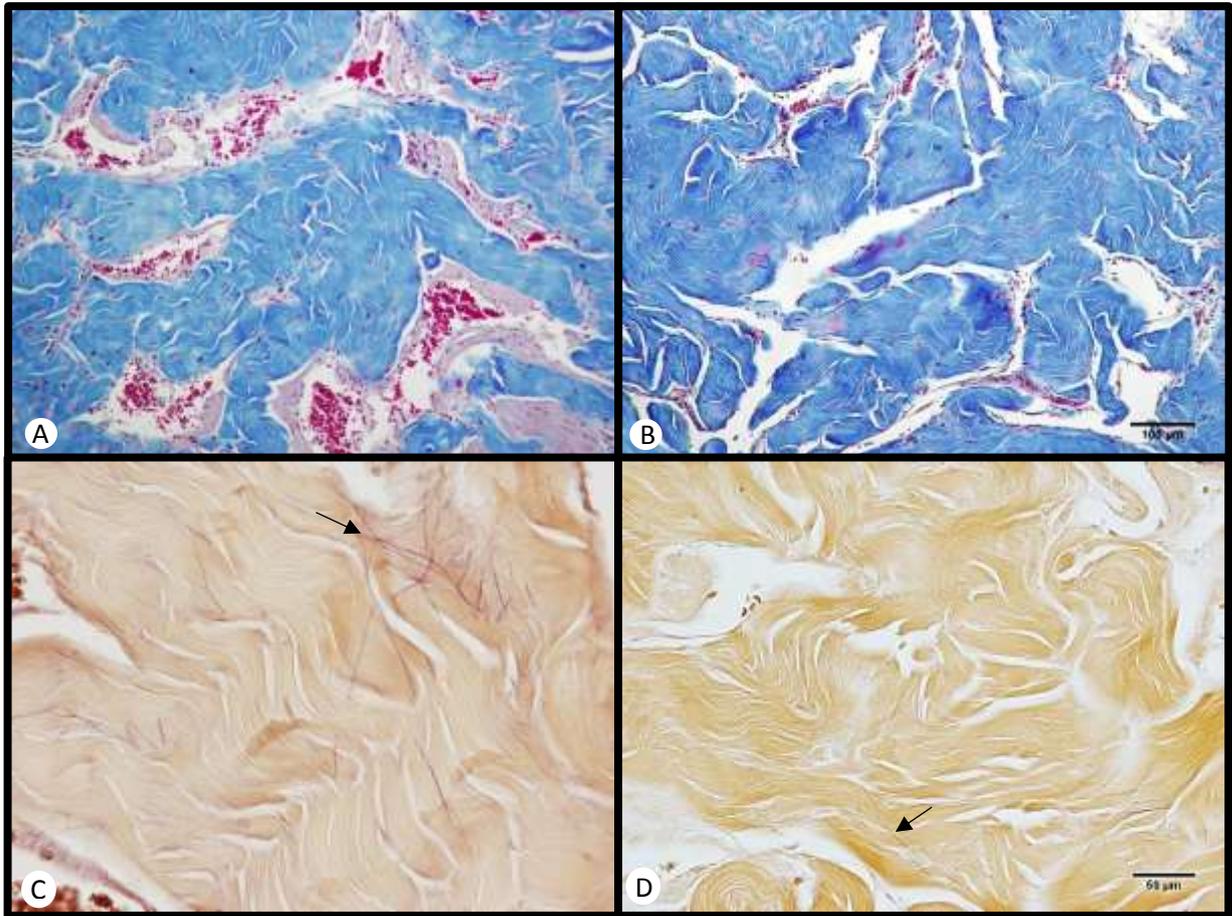


Legenda: O traçado amarelo indica a mensuração da área do corpo cavernoso com túnica albugínea, e o traçado vermelho indica a mensuração da área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea. Grupo CI10 (A) e grupo ECI10 (B). Tricrômico de Masson, 12x.

Fonte: A autora, 2017.

Quanto ao corpo cavernoso do pênis, houve diminuição significativa de 42% e de 59% da densidade volumétrica do músculo liso e das fibras do sistema elástico, respectivamente, e aumento de 5,5% da densidade volumétrica do tecido conjuntivo no grupo ECI10 comparado ao grupo CI10 (Figura 16). Não houve alteração quanto à densidade volumétrica do espaço sinusoidal entre os grupos ECI10 e CI10. Os dados estatísticos se encontram na tabela 2.

Figura 16. Fotomicrografias do corte transversal do corpo cavernoso do pênis dos ratos adultos de avaliação imediata.



Legenda. Rato adulto controle (A) e (C). Rato adulto estressado (B) e (D). As imagens da fileira superior foram coradas com Tricrômico de Masson, 200x. As imagens da fileira inferior foram coradas com fucsina resorcina de Weigert, 600x. As setas apontam para as fibras do sistema elástico.
Fonte: A autora, 2016.

Tabela 2. Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CI10) e estressado (ECI10) de ratos adultos de avaliação imediata.

	CI10	ECI10	P value
Testículo			
Epitélio seminífero Vv (%)	50,3 ± 1,94	54,6 ± 1,37	<0,01
Volume absoluto epitélio seminífero Av (ml)	0,91 ± 0,11	0,93 ± 0,08	0,68
Túnica própria Vv (%)	3,57 ± 0,41	3,42 ± 0,57	0,55
Volume absoluto túnica própria Av (ml)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,24
Lúmen tubular Vv (%)	35,8 ± 2,18	31,8 ± 1,24	<0,01
Volume absoluto lúmen tubular Av (ml)	0,65 ± 0,11	0,54 ± 0,05	0,02
Compartimento tubular Vv (%)	89,7 ± 1,40	89,8 ± 1,10	0,85
Volume absoluto compartimento tubular Av (ml)	1,64 ± 0,22	1,54 ± 0,13	0,30
Compartimento intertubular Vv (%)	10,2 ± 1,40	10,1 ± 1,10	0,85
Volume absoluto compartimento intertubular Av (ml)	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,33
Pênis			
Músculo liso Vv (%)	8,18 ± 1,98	4,70 ± 1,44	<0,01
Tecido conjuntivo Vv (%)	74,5 ± 3,41	78,6 ± 3,57	0,03
Espaço sinusóide Vv(%)	17,3 ± 3,79	16,7 ± 2,93	0,76
Fibras do sistema elástico Vv (%)	2,38 ± 1,00	0,98 ± 0,24	<0,01

Dados expressos como média e desvio padrão

Vv – densidade volumétrica

Av – volume absoluto

Fonte: A autora, 2016.

4.3 Efeitos tardios do estresse crônico em ratos pré-púberes

4.3.1 Análises biométricas

Houve um aumento significativo do peso corporal dos animais do grupo ECT4 na taxa de 14 % comparado ao grupo CT4. Nenhuma alteração foi encontrada com relação ao peso ($1,84 \pm 0,05$ g vs. $1,88 \pm 0,03$ g; $p=0,06$) e volume ($1,84 \pm 0,09$ ml vs. $1,86 \pm 0,06$ ml; $p=0,62$) testiculares dos animais do grupo ECT4 comparado ao CT4.

4.3.2 Análises dos espermatozoides e da testosterona sérica

Nenhuma alteração foi observada com relação à concentração ($1,15 \pm 0,48 \times 10^6$ /ml vs. $1,40 \pm 0,25 \times 10^6$ /ml; $p=0,20$), motilidade ($46,9 \pm 12,5$ % vs. $52,9 \pm 8,93$ %; $p=0,32$) e viabilidade ($9,06 \pm 4,80$ % vs. $10,3 \pm 3,83$ %; $p=0,55$) espermáticas nos animais do grupo ECT4 comparado ao grupo CT4.

Também não foram encontradas alterações quanto aos níveis séricos de testosterona nos animais do grupo ECT4 comparado ao grupo CT4 ($11,8 \pm 1,91$ ng/ml vs. $12,0 \pm 2,59$ ng/ml; $p=0,89$).

4.3.3 Análises histomorfométricas

Nenhuma alteração quanto a análise do diâmetro do túbulo seminífero ($291,4 \pm 12,2$ μ m vs. $290,1 \pm 7,35$ μ m; $p=0,79$) e altura do epitélio seminífero ($55,8 \pm 1,82$ μ m vs. $56,5 \pm 2,32$ μ m; $p=0,45$) foram observadas nos animais do grupo ECT4 comparados aos do grupo CT4.

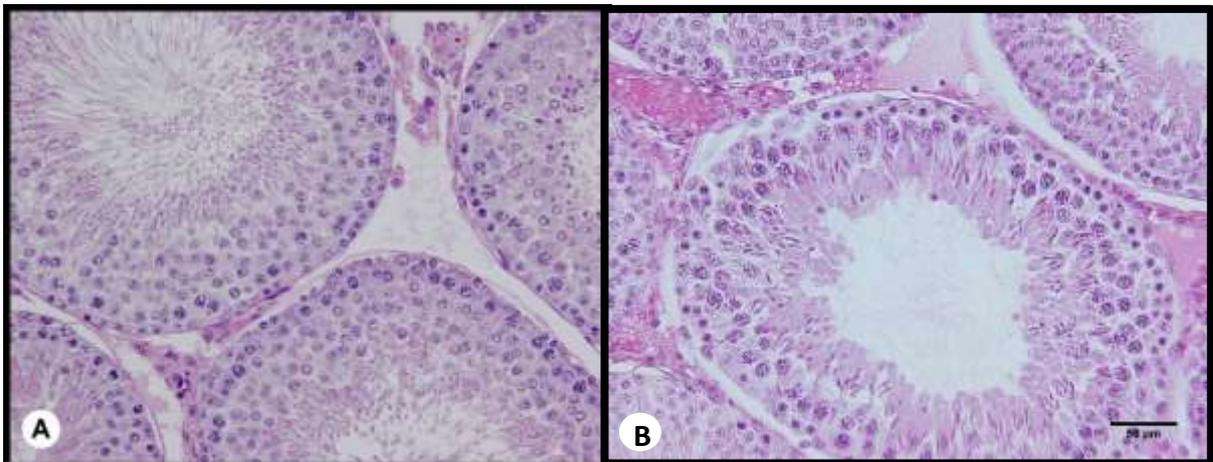
Não foram encontradas alterações também nas análises morfométricas da área do corpo cavernoso com túnica albugínea ($5,52 \pm 0,37$ mm² vs. $5,34 \pm 0,28$ mm²; $p=0,24$); da área do corpo cavernoso sem túnica albugínea ($3,47 \pm 0,33$ mm² vs. $3,33 \pm 0,23$ mm²; $p=0,28$) e da área

da túnica albugínea ($2,04 \pm 0,08 \text{ mm}^2$ vs. $2,00 \pm 0,12 \text{ mm}^2$; $p=0,40$) do pênis após o último estímulo estressor no grupo ECT4 quando comparado ao grupo CT4.

Os resultados da densidade volumétrica das estruturas testiculares mostram que no grupo ECT4 o compartimento tubular apresentou uma redução de 2%, enquanto que o compartimento intertubular apresentou um aumento de 18% quando comparados ao CT4. Quando avaliados em termos de volume absoluto nenhuma diferença no compartimento tubular foi encontrada, somente no compartimento intertubular em que este apresentou um aumento de 23% no grupo ECT4 comparado ao CT4 (Figura 17).

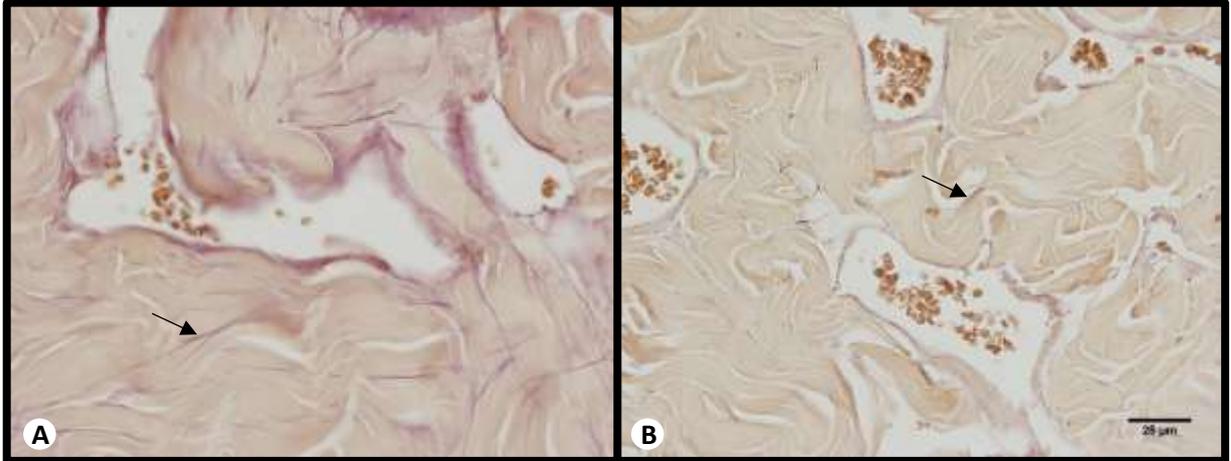
Com relação às estruturas do corpo cavernoso do pênis, houve uma redução de 48% da densidade volumétrica das fibras do sistema elástico no grupo ECT4 comparado ao grupo CT4 (Figura 18). Em todos os outros parâmetros não foram observadas alterações entre os grupos. Os dados estatísticos se encontram na tabela 3.

Figura 17. Fotomicrografias do corte transversal dos testículos dos ratos pré-púberes de avaliação tardia.



Legenda: As imagens A e B são dos grupos CT4 e ECT4, respectivamente. H&E, 400x.
Fonte: A autora, 2017.

Figura 18. Fotomicrografias do corte transversal do pênis dos ratos pré-púberes de avaliação tardia.



Legenda: As imagens A e B são dos grupos CT4 e ECT4, respectivamente. Fucsina resorcina de Weigert, 600x.
Fonte: A autora, 2017.

Tabela 3. Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CT4) e estressado (ECT4) de ratos pré-púberes de avaliação tardia.

	CT4	ECT4	P value
Testículo			
Epitélio seminífero Vv (%)	57,9 ± 2,48	57,9 ± 1,37	0,95
Volume absoluto epitélio seminífero Av (ml)	1,06 ± 0,05	1,09 ± 0,13	0,55
Túnica própria Vv (%)	2,96 ± 0,51	2,67 ± 0,69	0,32
Volume absoluto túnica própria Av (ml)	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,44
Lúmen tubular Vv (%)	31,7 ± 2,80	30,6 ± 1,93	0,34
Volume absoluto lúmen tubular Av (ml)	0,57 ± 0,06	0,57 ± 0,06	0,82
Compartimento tubular Vv (%)	92,5 ± 0,92	91,2 ± 0,66	<0,01
Volume absoluto compartimento tubular Av (ml)	1,69 ± 0,09	1,72 ± 0,19	0,65
Compartimento intertubular Vv (%)	7,41 ± 0,92	8,75 ± 0,66	<0,01
Volume absoluto compartimento intertubular Av (ml)	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,01
Pênis			
Músculo liso Vv (%)	8,13 ± 1,23	7,24 ± 1,00	0,11
Tecido conjuntivo Vv (%)	73,0 ± 2,55	73,8 ± 2,77	0,55
Espaço sinusóide Vv (%)	18,8 ± 3,06	19,1 ± 2,87	0,81
Fibras do sistema elástico Vv (%)	1,98 ± 0,38	1,03 ± 0,49	<0,01

Dados expressos como média e desvio padrão

Vv – densidade volumétrica

Av – volume absoluto

Fonte: A autora, 2016.

4.4 Efeitos tardios do estresse crônico em ratos adultos

4.4.1 Análises biométricas

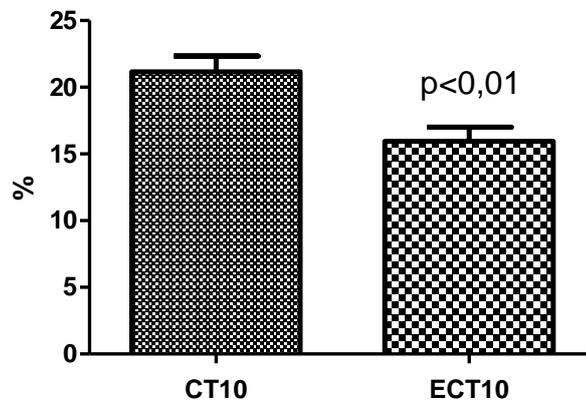
Nenhuma alteração em relação ao peso corporal final dos animais do grupo ECT10 foi encontrada quando comparado ao grupo CT10 ($395 \pm 31,0$ g vs. $406 \pm 46,3$ g; $p=0,56$). Nenhuma alteração referente ao peso ($1,80 \pm 0,08$ g vs. $1,86 \pm 0,23$ g; $p=0,31$) e volume testiculares ($1,81 \pm 0,10$ ml vs. $1,84 \pm 0,24$ ml; $p=0,49$) foi encontrada no grupo ECT10 quando comparado ao grupo CT10.

4.4.2 Análises do espermatozoides e testosterona sérica

Não houve diferença na concentração ($1,56 \pm 0,80 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $1,56 \pm 1,24 \times 10^6/\text{ml}$; $p=1,00$) e motilidade ($30,1 \pm 9,44$ % vs. $31,8 \pm 14,3$ %; $p=0,78$) espermáticas entre os grupos ECT10 e CT10. A viabilidade espermática dos animais do grupo ECT10 mostrou-se significativamente menor (24%) em comparação ao grupo CT10 ($15,9 \pm 3,2\%$ vs. $21,1 \pm 3,6\%$; $p<0,01$) (Gráfico 6).

Com relação aos níveis séricos de testosterona, não houve alteração no grupo ECT10 comparado ao grupo CT10 ($12,59 \pm 2,17$ ng/ml vs. $10,08 \pm 2,43$ ng/ml; $p=0,10$).

Gráfico 6. Viabilidade espermática



Legenda: Animais do grupo controle (CT10) e animais do grupo estresse adulto de avaliação tardia (ECT10).

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: A autora, 2015.

4.4.3 Análises histomorfométricas

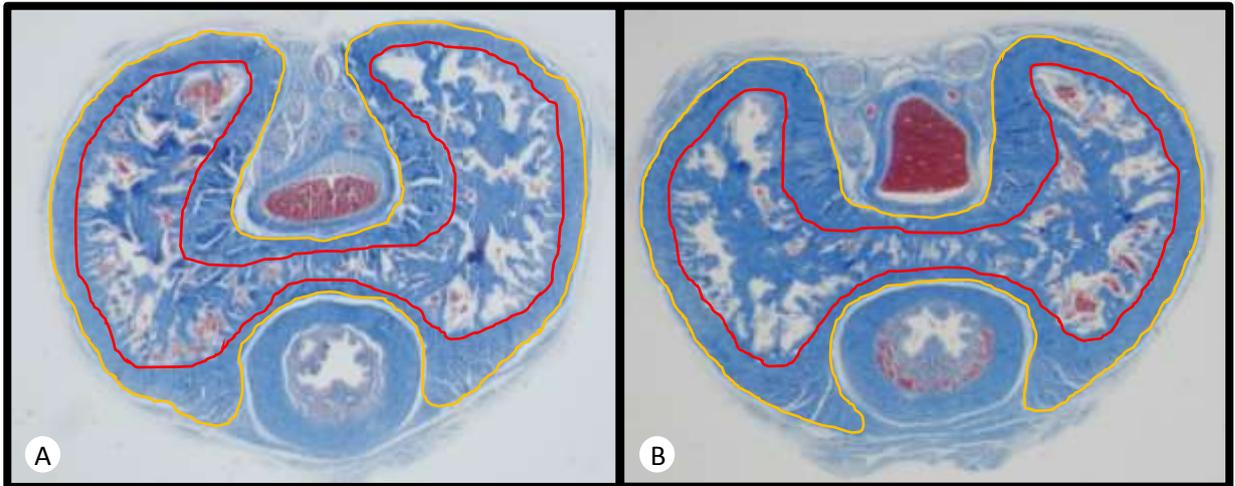
Nenhuma alteração foi observada em relação ao diâmetro do túbulo seminífero ($300,2 \pm 4,93 \mu\text{m}$ vs. $302,8 \pm 6,33 \mu\text{m}$; $p=0,38$) e à altura do epitélio seminífero ($51,2 \pm 1,93 \mu\text{m}$ vs. $51,7 \pm 2,11 \mu\text{m}$; $p=0,64$) no grupo ECT10 comparado ao grupo CT10.

Nenhuma alteração foi encontrada em relação à densidade volumétrica e ao volume absoluto das estruturas do compartimento tubular e intertubular testiculares. Os dados estatísticos se encontram na tabela 4.

No que se refere ao corpo cavernoso do pênis, nenhuma alteração foi encontrada na avaliação da área do corpo cavernoso com túnica albugínea ($6,75 \pm 0,44 \text{ mm}^2$ vs. $6,45 \pm 0,87 \text{ mm}^2$; $p=0,38$) e sem túnica albugínea ($4,39 \pm 0,40 \text{ mm}^2$ vs. $4,39 \pm 0,59 \text{ mm}^2$; $p=0,99$). A área da túnica albugínea apresentou aumento significativo de 14% no grupo ECT10 comparado ao grupo CT10 ($2,35 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ vs. $2,06 \pm 0,28 \text{ mm}^2$; $p=0,01$) (Figura 19).

Nenhuma diferença foi observada nos parâmetros de densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso do pênis (Figura 20).

Figura 19. Fotomicrografias do corte transversal do pênis dos ratos adultos de avaliação tardia.



Legenda: O traçado amarelo indica a mensuração da área do corpo cavernoso com túnica albugínea, e o traçado vermelho indica a mensuração da área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea. Grupo CT10 (A) e grupo ECT10 (B). Tricrômico de Masson, 12x.

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 4. Resultados numéricos das análises estatísticas da densidade volumétrica e do volume absoluto das estruturas dos compartimentos tubular e intertubular testiculares e da densidade volumétrica das estruturas do corpo cavernoso. Grupos controle (CT10) e estressado (ECT10) de ratos adultos de avaliação tardia.

	CT10	ECT10	P value
Testículo			
Epitélio seminífero Vv (%)	53,4 ± 1,61	52,8 ± 1,15	0,38
Volume absoluto epitélio seminífero Av (ml)	0,98 ± 0,15	0,96 ± 0,05	0,70
Túnica própria Vv (%)	3,92 ± 0,58	3,77 ± 0,49	0,55
Volume absoluto túnica própria Av (ml)	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,59
Lúmen tubular Vv (%)	32,4 ± 1,58	33,8 ± 1,61	0,08
Volume absoluto lúmen tubular Av (ml)	0,59 ± 0,07	0,61 ± 0,04	0,49
Compartimento tubular Vv (%)	89,8 ± 1,78	90,4 ± 0,87	0,35
Volume absoluto compartimento tubular Av (ml)	1,65 ± 0,23	1,65 ± 0,08	0,96
Compartimento intertubular Vv (%)	10,1 ± 1,78	9,51 ± 0,87	0,35
Volume absoluto compartimento intertubular Av (ml)	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,47
Pênis			
Músculo liso Vv (%)	7,89 ± 1,36	8,35 ± 0,88	0,40
Tecido conjuntivo Vv (%)	72,4 ± 3,37	71,6 ± 4,79	0,70
Espaço sinusóide Vv (%)	19,6 ± 2,85	19,4 ± 4,44	0,92
Fibras do sistema elástico Vv (%)	1,20 ± 0,50	1,18 ± 0,26	0,92

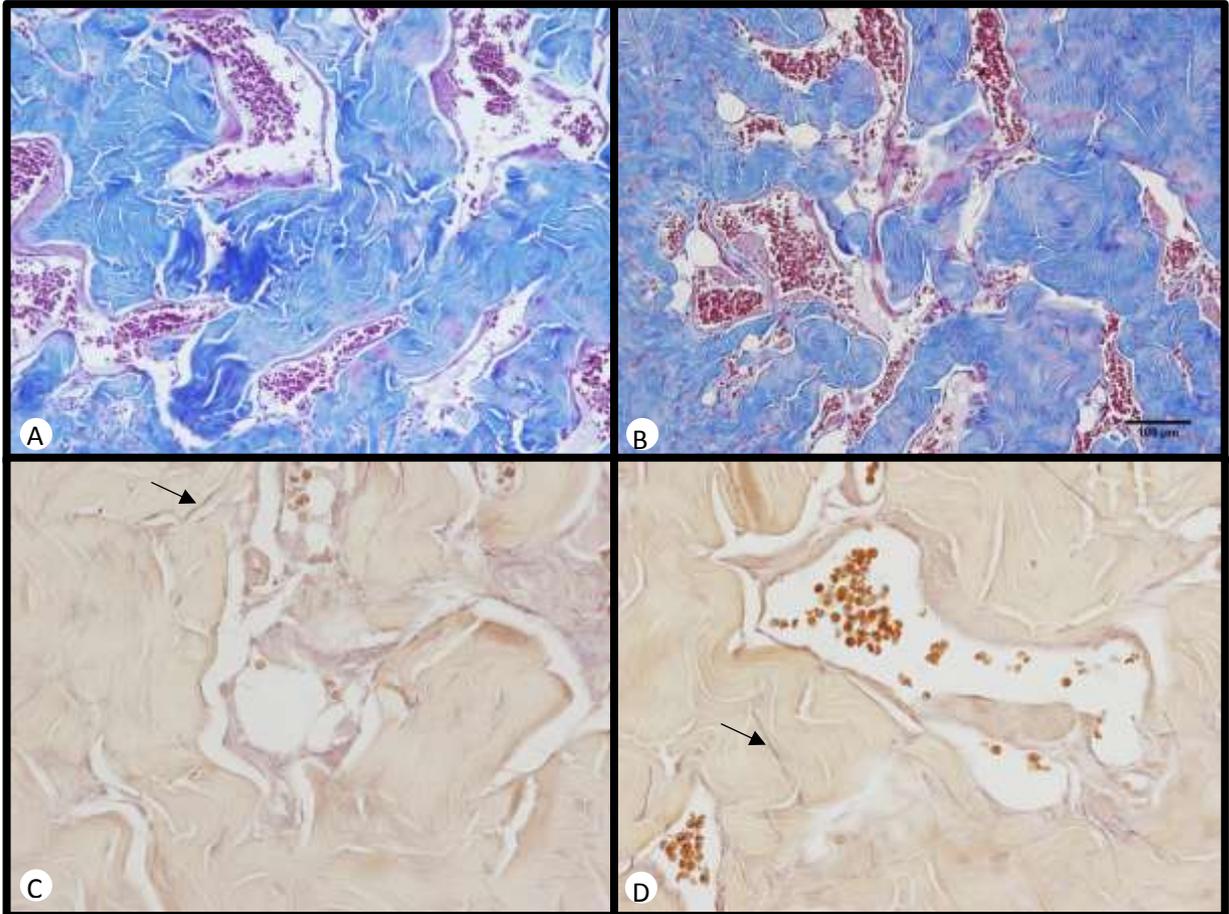
Dados expressos como média e desvio padrão

Vv – densidade volumétrica

Av – volume absoluto

Fonte: A autora, 2016.

Figura 20. Fotomicrografias do corte transversal do corpo cavernoso do pênis dos adultos de avaliação tardia.



Legenda. Rato adulto controle (A) e (C). Rato adulto estressado (B) e (D). As imagens da fileira superior foram coradas com Tricrômico de Masson, 200x. As imagens das fileiras inferior foram coradas com fucsina resorcina de Weigert, 600x. As setas apontam para as fibras do sistema elástico.

Fonte: A autora, 2016.

5. DISCUSSÃO

A morfologia e a função testicular dependem de condições adequadas de um microambiente tais como temperatura adequada, suprimento sanguíneo e estímulo hormonal (Damber and Janson 1978; Shalet 2009). O pênis também depende de um complexo mecanismo neurovascular e hormonal para manutenção de sua citoarquitetura e função (Dean and Lue 2005). O estresse, especialmente quando é repetitivo ou crônico, ativa o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, que afeta o funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Conseqüentemente, este mecanismo reduz a quantidade de hormônios sexuais (testosterona e estrogênio) em indivíduos estressados (Toufexis, Rivarola et al. 2014).

Como os testículos são os principais produtores de testosterona, que é essencial para manter a função testicular e peniana, alterações morfológicas e funcionais são esperadas em testículos e pênis de indivíduos estressados. Este é o primeiro estudo a analisar os efeitos imediato e tardio do estresse crônico em testículos e pênis de ratos pré-púberes e adultos.

5.1 Testículos

Neste estudo, o estresse crônico foi mais prejudicial quando induzido na idade adulta, e avaliado imediatamente. Por exemplo, os níveis séricos de testosterona diminuíram somente nos ratos adultos submetidos ao estímulo estressor, mas na avaliação tardia, os níveis retornaram aos valores normais. O estresse crônico aumenta os níveis de glicocorticoides (Ulrich-Lai and Herman 2009), suprimindo assim a liberação de gonadotropinas e atuando diretamente nos receptores das células de Leydig, inibindo a biossíntese de testosterona (O'Donnell, McLachlan et al. 1994). Isso poderia explicar os baixos níveis do hormônio sexual masculino nos ratos adultos estressados de avaliação imediata, e a recuperação dos níveis séricos de testosterona nos animais adultos avaliados tardiamente, quando a biossíntese de testosterona não foi mais inibida.

Mudanças nos parâmetros espermáticos como viabilidade e motilidade foram encontradas apenas nos ratos submetidos a estímulos de estresse crônico na idade adulta (Lin, Yuan et al. 2014). O estudo de Nirupama et al. (Nirupama, Devaki et al. 2013) demonstrou alterações na concentração de espermatozoides em ratos adultos submetidos ao estresse por 60

dias. Provavelmente, as mudanças na concentração de espermatozoides só se tornam visíveis após períodos mais prolongados de estresse. Embora neste estudo o estresse induzido nos ratos adultos não foi suficiente para reduzir a concentração de espermatozoides, a motilidade e viabilidade dos espermatozoides foram reduzidas em 19% e 46%, respectivamente, nos animais adultos avaliados imediatamente após o último estímulo estressor ter sido aplicado, suficiente para prejudicar a função reprodutiva.

Mudanças morfológicas mais evidentes nos túbulos seminíferos foram observadas no grupo estresse adulto de avaliação imediata. Além dos parâmetros alterados dos túbulos seminíferos, o peso e o volume testiculares foram reduzidos, caracterizando atrofia do órgão. Isso mostrou claramente que os efeitos do estresse crônico foram mais pronunciados nos ratos adultos. Os ratos pré-púberes submetidos ao estresse crônico e avaliados imediatamente após o término do estímulo estressor mostraram uma diminuição significativa no peso corporal. Embora os ratos submetidos ao estímulo estressor não tenham tido acesso a comida e água durante 2 h por dia, os grupos controles também foram submetidos a essa restrição durante o mesmo período. A perda de peso nos ratos estressados durante a puberdade foi demonstrado em estudos anteriores (de Souza, Silva et al. 2012). O maior gasto energético em situações de estresse pode explicar a perda de peso (Goldstein 2010). A perda de peso indicou que outros órgãos podem ser afetados pelo estresse crônico, conforme demonstrado pelos diâmetros reduzidos dos túbulos seminíferos nos ratos submetidos ao estresse crônico. As condições de estresse crônico durante a infância podem levar a depressão e ansiedade, bem como obesidade e síndrome metabólica (Goldstein 2010). Crianças e adolescentes com aumento da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal têm maior ganho de peso na idade adulta (Anderson, Cohen et al. 2006; Goldstein 2010). O estresse crônico causou diferentes e permanentes (sistêmico e testicular) mudanças na idade adulta quando aplicado antes da puberdade. Os ratos pré-púberes avaliados tardiamente tiveram aumento do peso corporal, indicando uma tendência para a obesidade no futuro. O estresse crônico aplicado antes da puberdade resultou em importantes alterações testiculares, com alterações tardias na idade adulta. Alterações morfológicas foram encontradas na avaliação realizada 6 semanas após o fim do estímulo estressor, mas nenhuma alteração foi encontrada imediatamente. Por exemplo, o espaço ocupado pelo interstício foi aumentado, enquanto que o espaço ocupado pelo compartimento tubular diminuiu somente quando avaliados mais tarde.

Os resultados do presente estudo destacam a importância de evitar estímulos de estresse na infância, visto que ratos expostos ao estresse crônico antes da puberdade desenvolveram uma redução significativa na densidade do compartimento tubular, e um aumento na densidade do

compartimento intertubular, quando avaliados 6 semanas após o último estímulo estressor. Como os testículos não apresentaram alterações de volume e peso, o compartimento tubular dos animais parece ter sido reduzido, sugerindo que um efeito tardio do estresse crônico pode causar comprometimento funcional no futuro. Nenhum estudo investigou os efeitos do estresse crônico na função reprodutiva em homens que sofreram algum tipo de estresse antes da puberdade. Almeida et al. (Almeida, Kempinas et al. 2000) mostraram que os ratos submetidos a estímulos de estresse por imobilização antes da puberdade apresentaram redução da fertilidade. Embora o estresse tenha sido mais intenso do que o aplicado em nosso trabalho, nossos resultados reforçam a ideia de que as mudanças provocadas pelo estresse crônico antes da puberdade pode ser de caráter permanente. Com base nas alterações morfológicas nos testículos dos ratos pré-púberes, podemos supor que o dano testicular seja mais permanente se o estresse crônico ocorrer na infância. Os ratos submetidos ao estresse crônico na idade adulta mostraram várias mudanças na morfologia testicular, nos parâmetros espermáticos e nos níveis séricos de testosterona quando avaliados logo após o fim do estímulo estressor. No entanto, apenas a viabilidade espermática foi reduzida quando os ratos foram avaliados tardiamente. A redução da viabilidade espermática foi maior (46%) nos ratos avaliados imediatamente após o término do estímulo estressor do que nos ratos avaliados tardiamente (24%). Portanto, os efeitos do estresse crônico em ratos adultos foram quase completamente revertidos após a interrupção do estímulo estressor. Algumas alterações na produção de espermatozoides foram relatadas em até 4 meses após a interrupção do estímulo estressor (Nirupama, Devaki et al. 2013). Embora o estresse crônico tenha promovido alterações significativas nos parâmetros testiculares estudados nos ratos adultos, os testículos recuperaram-se quase completamente após o fim do estímulo estressor. Homens com estilo de vida estressante são mais propensos a problemas de fertilidade (Nordkap, Jensen et al. 2016). Um relato mostrou que o estresse paterno no trabalho está associado com diminuição no número de concepções (Lee, Paek et al. 2009). Nossos resultados sugerem que se houver uma mudança nos hábitos, retirando-se a fonte estressora, os danos podem ser revertidos, e isto deveria ser um fator importante a ser considerado no tratamento da infertilidade. Ainda, essas mudanças no estilo de vida beneficiaria não somente o homem, mas também o casal, além de trazer melhorias para a sua vida social.

5.2 Pênis

O estresse crônico também pode provocar disfunção erétil (Hedon 2003). Esta condição está relacionada a distúrbios psicológicos e/ou hormonais desencadeados por fatores estressantes com redução principalmente da testosterona (Hehemann and Kashanian 2016). No entanto, ainda pouco se conhece sobre os potenciais efeitos deletérios do estresse crônico sobre as estruturas penianas, em especial ao principal tecido erétil, o corpo cavernoso.

Algumas condições conhecidas, como doenças cardiovasculares e tabagismo, podem desencadear disfunção erétil, pois estão relacionadas a baixas concentrações de testosterona sérica (Park, Ko et al. 2012; Canat, Canat et al. 2015). Um estudo realizado por nosso grupo mostrou que o estresse crônico diminui os níveis de testosterona associada a alterações estruturais do corpo cavernoso do pênis (de Souza, Silva et al. 2012). O presente estudo observou que somente animais adultos, logo após o último estímulo estressor, apresentaram redução estatisticamente significativa de testosterona sérica. Isto sugere que animais adultos são mais vulneráveis a alteração hormonal sob situações de estresse por imobilização. Este grupo apresentou as alterações estruturais mais importantes.

A ereção peniana basicamente envolve o relaxamento do músculo liso do espaço sinusoidal, vasodilatação arterial e veno-oclusão (van Driel 2015). Se alguma dessas estruturas for danificada, pode prejudicar a ereção. Neste estudo, os animais adultos estressados de avaliação imediata apresentaram diminuição significativa da densidade volumétrica do músculo liso. Também foi observado diminuição de fibras do sistema elástico e aumento da densidade volumétrica do tecido conjuntivo, o que pode comprometer a complacência do órgão. Um estudo realizado em biópsia de pênis de homens com DE, mostrou redução significativa das fibras do sistema elástico (Costa, Carrerete et al. 2006), o que reforça a diminuição da complacência. Foi observado que nestes animais, as áreas do corpo cavernoso avaliadas com e sem túnica albugínea reduziram. Essas alterações estruturais associadas à redução significativa da testosterona nestes animais mostram a importância deste hormônio na manutenção dos constituintes penianos.

Quando os animais adultos foram avaliados seis semanas após o último estímulo estressor, houve recuperação das estruturas cavernosas afetadas e dos níveis séricos de testosterona. Entretanto, nestes animais os índices de testosterona aumentaram, embora não estatisticamente significativo, em relação grupo controle, o que pode estar relacionado a um mecanismo compensatório. A área da túnica albugínea, que não havia sido alterada com o

estresse, apresentou-se maior nestes animais. Isso talvez possa estar relacionado ao aumento não significativo da testosterona. Estes resultados mostraram a importância da testosterona na integridade das estruturas cavernosas do pênis. Este dado é ainda reforçado pelo estudo de Miranda et al. que mostraram que a reposição de testosterona em ratos após dois meses submetidos à orquiectomia, a musculatura lisa do corpo cavernoso do pênis retorna ao normal (Miranda, Gallo et al. 2012).

As alterações nos corpos cavernosos peniano dos animais adultos sob estresse crônico, mencionadas anteriormente, são condizentes com alterações encontradas na DE. No entanto, após longo período sem estresse, houve recuperação das estruturas cavernosas, concomitante normalização da testosterona. Este dado é importante, pois homens com DE, em que o estresse é o agente causador, a indicação da retirada do fator estressante nesses indivíduos pode normalizar a função erétil sem a necessidade de medicamentos.

De Souza et al. (de Souza, Silva et al. 2012) mostraram que ratos estressados cronicamente antes da puberdade até a fase adulta apresentam redução da testosterona sérica, do músculo liso do corpo cavernoso e aumento do tecido conjuntivo. Diferente deste presente estudo, de Souza et al. não privaram os animais do grupo controle de água e comida. A restrição alimentar provoca um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos e isso indica que pode causar um período de estresse nesses animais. Embora isso aconteça, é considerado um estressor de baixa intensidade (Spolidoro, Baroncelli et al. 2011). Baseado nesta informação podemos sugerir que a restrição alimentar nos animais do grupo controle pode ter provocado um estresse de baixa intensidade, e por isso nossos resultados diferem dos resultados encontrados por de Souza et al. (2012).

No entanto, o que chamou a atenção foram as alterações observadas no grupo pré-púbere avaliado tardiamente. Foram observadas que nestes animais as fibras do sistema elástico sofreram redução significativa. Esta alteração pode comprometer a complacência do órgão e prejudicar a ereção. Em homens, não existem dados na literatura sobre os efeitos a longo prazo no pênis após serem submetidos a situações de estresse crônico antes da puberdade. Este é o primeiro estudo que mostrou que o estresse crônico aplicado antes da puberdade pode lesionar uma estrutura do corpo cavernoso peniano na idade adulta, mesmo após longo período sem estímulo estressor. Isso pode explicar ou ajudar na elucidação de questões relacionadas a problemas de ereção em adultos que sofreram algum tipo de estresse na infância. Este resultado mostrou a importância de se evitar na infância a exposição a fatores estressantes, cujas consequências podem se manifestar na idade adulta.

Embora o estudo tenha utilizado ratos para estudar os efeitos do estresse crônico no corpo cavernoso peniano, mostramos, baseados em estudos anteriores, que ainda são considerados bons modelos. Pinheiro et al. (2000) mostraram que existem diferenças quanto à disposição e quantidade dos principais componentes do corpo cavernoso do pênis do rato comparado ao do homem, e ressaltam a importância desse conhecimento para utilização desses animais como modelos experimentais para DE (Pinheiro, Costa et al. 2000). Quando se compara estudos experimentais nesses animais com estudos clínicos em homens, o corpo cavernoso do pênis de rato se comporta de maneira similar ao do homem na presença de baixas concentrações de testosterona (de Souza, Silva et al. 2012; Iacono, Prezioso et al. 2012). Estas considerações mostraram que o rato pode ser considerado um bom modelo.

A função erétil desses animais não foi avaliada. Contudo, fundamentado em nossos resultados, podemos afirmar que o estresse crônico é prejudicial ao corpo cavernoso peniano, aplicado antes ou após a puberdade, e pode estar associado ao aparecimento de disfunção erétil. Um estudo em ratos mostrou que a função erétil pode ser comprometida por estresse por imobilização. Ao estimular o nervo cavernoso nesses ratos, tanto a pressão intracavernosa quanto o tempo de detumescência diminuíram (Bal, Murat et al. 2009). Mesmo que não sejam observadas alterações significativas logo após o último estímulo estressor no grupo pré-púbere de avaliação imediata, estas não podem ser ignoradas, pois podem manifestar-se muito tempo depois. Esse fato importante deve ser considerado, não devendo ser um fator excludente na avaliação da disfunção erétil.

O estudo foi realizado em um modelo animal dentro de condições experimentais controladas, de modo que os resultados podem não representar exatamente os eventos que poderiam ocorrer em homens estressados. As alterações testiculares e penianas podem variar de acordo com o tipo, intensidade e duração do estímulo estressor, bem como a idade do organismo. Portanto, as diferenças entre os resultados do presente estudo e a literatura pertinente ao assunto podem ser imputadas a esses fatores.

CONCLUSÕES

O estresse crônico induziu alterações testiculares e penianas antes e após a puberdade. As mudanças foram mais significativas quando o estímulo estressor foi induzido na idade adulta. A maioria das alterações identificadas nos ratos estressados durante a vida adulta são revertidas após o fim da indução do estímulo estressor.

Nos ratos estressados antes da puberdade, as alterações testiculares e penianas são mais evidentes após longo período sem o estímulo estressor.

Estes resultados sugerem que o estresse crônico pode estar relacionado a problemas ligados à fertilidade masculina e disfunção erétil.

REFERÊNCIAS

- Agarwal, A., A. Mulgund, A. Hamada and M. R. Chyatte . (2015). "A unique view on male infertility around the globe." *Reprod Biol Endocrinol* 13: 37.
- Ahmadi, M. R., M. Yasemi, H. Peyman, K. Hemati, J. Khajavikhan, M. Yaghoubi and L. Bimanand. (2014). "Associated factors with male infertility: a case control study." *J Clin Diagn Res* 8(9): FC11-3.
- Almeida, S. A., S. O. Petenusci, J. A. Anselmo-Franci, A. A. Rosa-e-Silva and T. L. Lamaso-Carvalho. (1998). "Decreased spermatogenic and androgenic testicular functions in adult rats submitted to immobilization-induced stress from prepuberty." *Braz J Med Biol Res* 31(11): 1443-8.
- Almeida, S. A., S. O. Petenusci, J. A. Franci, A. A. Rosa e Silva, T. L. Carvalho (2000). "Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in pubertal rats." *Andrologia* 32(1): 7-11.
- Almeida, S. A., W. G. Kempinas and T. L. Lamaso Carvalho. (2000). "Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress." *Braz J Med Biol Res* 33(9): 1105-9.
- Alves, M. G., L. Rato, R. A. Carvalho, P. I. Moreira, S. Socorro and P. F. Oliveira. (2013). "Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis." *Cell Mol Life Sci* 70(5): 777-93.
- Anderson, S. E., P. Cohen, E. N. Naumova and A. Must. (2006). "Association of depression and anxiety disorders with weight change in a prospective community-based study of children followed up into adulthood." *Arch Pediatr Adolesc Med* 160(3): 285-91.
- Armario, A. (2006). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors?" *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(5): 485-501.
- Bal, E., N. Murat, O. Demir, B. C. Soner, E. Can, S. Gidener and A. Esen. (2009). "Restraint stress impairs erectile responses in rats." *Tohoku J Exp Med* 217(3): 239-42.
- Bitgul, G., I. Tekmen, D. Keles and G. Oktay (2013). "Protective Effects of Resveratrol against Chronic Immobilization Stress on Testis." *ISRN Urol* 2013: 278720.
- Canat, L., M. Canat, B. Guner, C. Gurbuz and T. Caşkurlu (2015). "Association between renal function, erectile function and coronary artery disease: detection with coronary angiography." *Korean J Urol* 56(1): 76-81.
- Charpenet, G., Y. Tache, M. Bernier, J. R. Ducharme and R. Collu (1982). "Stress-induced testicular hyposensitivity to gonadotropin in rats. Role of the pituitary gland." *Biol Reprod* 27(3): 616-23.
- Chrousos, G. P. and P. W. Gold (1992). "The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis." *JAMA* 267(9): 1244-52.
- Cooper, T. G. (2007). "Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem." *Asian J Androl* 9(4): 533-9.

- Costa, W. S., F. B. Carrerete, W. G. Horta and F. J. Sampaio. (2006). "Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction." *BJU Int* **97**(3): 567-9.
- Damber, J. E. and P. O. Janson (1978). "The influence of scrotal warming on testicular blood flow and endocrine function in the rat." *Acta Physiol Scand* **104**(1): 61-7.
- de Souza, D. B., D. Silva, C. M. Cortez, W. S. Costa and F. J. Sampaio. (2012). "Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats." *J Androl* **33**(4): 735-9.
- Dean, R. C. and T. F. Lue (2005). "Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction." *Urol Clin North Am* **32**(4): 379-95, v.
- Dombrowicz, D., B. Sente, E. Reiter, J. Closset and G. Hennen (1996). "Pituitary control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis." *J Androl* **17**(6): 639-50.
- Dubey, A. K. and T. M. Plant (1985). "A suppression of gonadotropin secretion by cortisol in castrated male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) mediated by the interruption of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release." *Biol Reprod* **33**(2): 423-31.
- Durairajanayagam, D. (2018). "Lifestyle causes of male infertility." *Arab Journal of Urology* **12**(004).
- Farias, J. G., E. Bustos-Obregon, R. Orellana, J. L. Bucarey, E. Quiroz and J. G. Reyes (2005). "Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism." *Andrologia* **37**(1): 47-52.
- Garcia-Diaz, E. C., L. E. Gomez-Quiroz, E. Arenas-Rios, A. Aragon-Martinez, J. A. Ibarra-Arias and I. R. M. M. del Socorro. (2015). "Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat." *Syst Biol Reprod Med* **61**(3): 150-60.
- Goldstein, A. M. and H. Padma-Nathan (1990). "The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton." *J Urol* **144**(5): 1144-6.
- Goldstein, D. S. (2010). "Adrenal responses to stress." *Cell Mol Neurobiol* **30**(8): 1433-40.
- Griswold, M. D. (1998). "The central role of Sertoli cells in spermatogenesis." *Semin Cell Dev Biol* **9**(4): 411-6.
- Hedon, F. (2003). "Anxiety and erectile dysfunction: a global approach to ED enhances results and quality of life." *Int J Impot Res* **15 Suppl 2**: S16-9.
- Hehemann, M. C. and J. A. Kashanian (2016). "Can lifestyle modification affect men's erectile function?" *Transl Androl Urol* **5**(2): 187-94.
- Heim, C., D. J. Newport, S. Heit, Y. P. Graham, M. Wilcox, R. Bonsall, A. H. Miller and C. B. Nemeroff (2000). "Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood." *JAMA* **284**(5): 592-7.
- Hill, C. M., M. D. Anway, B. R. Zirkin, T. R. Brown (2004). "Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells." *Biol Reprod* **71**(4): 1348-58.

- Hsieh, C. H., S. P. Liu, G. L. Hsu, H. S. Chen, E. Molodysky, Y. H. Chen and H. J. Yu. (2012). "Advances in understanding of mammalian penile evolution, human penile anatomy and human erection physiology: clinical implications for physicians and surgeons." Med Sci Monit **18**(7): RA118-25.
- Hsu, G. L., C. H. Hsieh, H. S. Wen, Y. C. Chen, S. C. Chen and M. S. Mok (2003). "Penile venous anatomy: an additional description and its clinical implication." J Androl **24**(6): 921-7.
- Hsu, G. L., C. H. Hsieh, H. S. Wen, W. L. Hsu, C. H. Wu, T. H. Fong, S. C. Chen and G. F. Tseng (2004). "Anatomy of the human penis: the relationship of the architecture between skeletal and smooth muscles." J Androl **25**(3): 426-31.
- Hwang, E. C., K. J. Oh, S. I. Jung, N. N. Kim, K. Y. Ahn and K. Park. (2011). "Effects of androgen on the expression of vascular endothelial growth factor in the penile corpus cavernosum." Urology **77**(6): 1381-6.
- Iacono, F., D. Prezioso, A. Ruffo, E. Illiano, L. Romis, G. Di Lauro, G. Romeo and B. Amato (2012). "Testosterone deficiency causes penile fibrosis and organic erectile dysfunction in aging men. Evaluating association among Age, TDS and ED." BMC Surg **12** Suppl 1: S24.
- Jalali, M., G. Saki, A. R. Sarkaki, K. Karami and S. Nasri (2012). "Effect of noise stress on count, progressive and non-progressive sperm motility, body and genital organ weights of adult male rats." J Hum Reprod Sci **5**(1): 48-51.
- Janevic, T., L. G. Kahn, P. Landsbergis, P. M. Cirillo, B. A. Cohn, X. Liu and P. Factor-Litvak (2014). "Effects of work and life stress on semen quality." Fertil Steril **102**(2): 530-8.
- Junqueira L. C. U., José Carneiro (2011). *Histologia Básica*. 11^a ed. Rio de Janeiro.
- Kamel, F. and C. L. Kubajak (1987). "Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action." Endocrinology **121**(2): 561-8.
- Kanter, M., C. Aktas and M. Erbogga (2013). "Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study." Toxicol Ind Health **29**(2): 99-113.
- Keith L. Moore A.F.D. (2001). *Anatomia orientada para a clínica*. 6^a edição –Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Lee, M. S., D. Paek, K. D Eum, J. Siegrist, J. Li, H. E. Lee and S. I. Cho (2009). "Paternal work stress and prolonged time to pregnancy." Int Arch Occup Environ Health **82**(2): 209-16.
- Lin, H., K. M. Yuan, H. Y. Zhou, T. Bu, H. Su, S. Liu, Q. Zhu, Y. Wang, Y. Hu, Y. Shan, Q. Q. Lian, X. Y. Wu and R. S. Ge (2014). "Time-course changes of steroidogenic gene expression and steroidogenesis of rat Leydig cells after acute immobilization stress." Int J Mol Sci **15**(11): 21028-44.
- Lu, W. P., X. T. Mei, Y. Wang, Y. P. Zheng, Y. F. Xue and D. H. Xu (2015). "Zn(II)-curcumin protects against oxidative stress, deleterious changes in sperm parameters and histological alterations in a male mouse model of cyclophosphamide-induced reproductive damage." Environ Toxicol Pharmacol **39**(2): 515-24.

- Mahmoud, H., O. Mahmoud, K. Layasadat, A. Naeim (2009). "Dexamethasone effects on Bax expression in the mouse testicular germ cells." Folia Histochem Cytobiol **47**(2): 237-41.
- McCabe, M. P., I. D. Sharlip, R. Lewis, E. Atalla, R. Balon, A. D. Fisher, E. Laumann, S. W. Lee and R. T. Segraves (2016). "Incidence and Prevalence of Sexual Dysfunction in Women and Men: A Consensus Statement from the Fourth International Consultation on Sexual Medicine 2015." J Sex Med **13**(2): 144-52.
- Miranda, A. F., C. B. Gallo, D. B. de Souza, W. S. Costa and F. J. Sampaio (2012). "Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa." J Androl **33**(6): 1224-32.
- Murakami, R. (1987). "A histological study of the development of the penis of wild-type and androgen-insensitive mice." J Anat **153**: 223-31.
- Netter, F. H. (2011). Atlas de Anatomia Humana. 5^a ed. Rio de Janeiro.
- Nirupama, M., M. Devaki, R. Nirupama and H. N. Yajurvedi (2013). "Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat." J Physiol Biochem **69**(1): 59-68.
- Nordkap, L., T. K. Jensen, A. M. Hansen, T. H. Lassen, A. K. Bang, U. N. Joensen, M. Blomberg Jensen, N. E. Skakkebaek and N. Jorgensen (2016). "Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men." Fertil Steril **105**(1): 174-87 e1-2.
- O'Donnell, L., R. I. McLachlan, N. G. Wreford and D. M. Robertson (1994). "Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle." Endocrinology **135**(6): 2608-14.
- Papagiannopoulos, D., N. Khare and A. Nehra (2015). "Evaluation of young men with organic erectile dysfunction." Asian J Androl **17**(1): 11-6.
- Park, M. G., K. W. Ko, m. M. Oh, J. H. Bae, J. J. Kim and G. Moon du (2012). "Effects of smoking on plasma testosterone level and erectile function in rats." J Sex Med **9**(2): 472-81.
- Pinheiro, A. C., W. S. Costa, L. E. Cardoso and F. J. Sampaio (2000). "Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis." J Urol **164**(5): 1802-6.
- Potemina, T. E. (2008). "Impairment of spermatogenesis in male rats during stress." Bull Exp Biol Med **145**(6): 700-2.
- Priya, P. H. and P. S. Reddy (2012). "Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats." J Exp Zool A Ecol Genet Physiol **317**(7): 455-65.
- Rasooli, A., M. Taha Jalali, M. Nouri, B. Mohammadian and F. Barati (2010). "Effects of chronic heat stress on testicular structures, serum testosterone and cortisol concentrations in developing lambs." Anim Reprod Sci **117**(1-2): 55-9.
- Ribeiro, C. T., R. Milhomem, D. B. de Souza, W. S. Costa, F. J. Sampaio and M. A. Pereira-Sampaio (2014). "Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages." J Urol **191**(5 Suppl): 1578-84.

Richard L. Drake, W. V., Adam W. M. Mitchell (2015). 2ª edição. Gray's Anatomia Clínica para estudantes, Elsevier.

Russel L. D., R. A. Ettlín, A. P. Sinha Hikim and E. D. Clegg (1990). "Mammalian spermatogenesis." Histological and histopathological evaluation of the testis, Cache River Press: 1-40.

Sahin, A., A. Urkmez, A. Verit, O. H. Yuksel and F. F. Verit (2017). "Psychologic and sexual dysfunction in primary and secondary infertile male patients." Arch Ital Urol Androl **89**(2): 120-124.

Saki, G., F. Rahim and K. Alizadeh (2009). "Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats." J Hum Reprod Sci **2**(2): 72-5.

Schneiderman, N., G. Ironson and S. D. Siegel (2005). "Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants." Annu Rev Clin Psychol **1**: 607-28.

Seyam, R. M., S. A. Kattan, L. W. Assad, R. M. El-Sayed and F. H. Almohanna (2012). "Penile autotransplantation in rats: An animal model." Urol Ann **5**(4): 255-8.

Shalet, S. M. (2009). "Normal testicular function and spermatogenesis." Pediatr Blood Cancer **53**(2): 285-8.

Sheiner, E. K., E. Sheiner, R. D. Hammel, G. Potashnik and R. Carel (2003). "Effect of occupational exposures on male fertility: literature review." Ind Health **41**(2): 55-62.

Shields, G. S. and G. M. Slavich (2017). "Lifetime Stress Exposure and Health: A Review of Contemporary Assessment Methods and Biological Mechanisms." Soc Personal Psychol Compass **11**(8).

Song, S. H., D. S. Kim, S. H. Shim, J. J. Lim and S. C. Yang (2016). "Usage and perceptions of phosphodiesterase type 5 inhibitors among the male partners of infertile couples." Clin Exp Reprod Med **43**(1): 26-30.

Spolidoro, M., L. Baroncelli, E. Putignano, J. F. Maya-Vetencourt, A. Viegi and L. Maffei (2011). "Food restriction enhances visual cortex plasticity in adulthood." Nat Commun **2**: 320.

Stephens, M. A. and G. Wand (2012). "Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence." Alcohol Res **34**(4): 468-83.

Svingen, T. and P. Koopman (2013). "Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations." Genes Dev **27**(22): 2409-26.

Tal, R., B. B. Voelzke, S. Land, P. Motarjem, R. Munarriz, I. Goldstein and J. P. Mulhall (2009). "Vasculogenic erectile dysfunction in teenagers: a 5-year multi-institutional experience." BJU Int **103**(5): 646-50.

Teerds, K. J., D. G. de Rooij, F. F. Rommerts, R. van den Hurk and C. J. Wensing (1989). "Proliferation and differentiation of possible Leydig cell precursors after destruction of the existing Leydig cells with ethane dimethyl sulphonate: the role of LH/human chorionic gonadotrophin." J Endocrinol **122**(3): 689-96.

- Teicher, M. H. and J. A. Samson (2016). "Annual Research Review: Enduring neurobiological effects of childhood abuse and neglect." J Child Psychol Psychiatry **57**(3): 241-66.
- Toufexis, D., M. A. Rivarola, H. Lara and V. Viau (2014). "Stress and the reproductive axis." J Neuroendocrinol **26**(9): 573-86.
- Traish, A. and N. Kim (2005). "The physiological role of androgens in penile erection: regulation of corpus cavernosum structure and function." J Sex Med **2**(6): 759-70.
- Traish, A. M. (2009). "Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: a review." J Androl **30**(4): 363-9.
- Traish, A. M., I. Goldstein and N. N. Kim (2007). "Testosterone and erectile function: from basic research to a new clinical paradigm for managing men with androgen insufficiency and erectile dysfunction." Eur Urol **52**(1): 54-70.
- Ulrich-Lai, Y. M. and J. P. Herman (2009). "Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses." Nat Rev Neurosci **10**(6): 397-409.
- van Driel, M. F. (2015). "Physiology of Penile Erection-A Brief History of the Scientific Understanding up till the Eighties of the 20th Century." Sex Med **3**(4): 349-57.
- Wang, F. F., Q. Wang, Y. Chen, Q. Lin, H. B. Gao and P. Zhang (2012). "Chronic stress induces ageing-associated degeneration in rat Leydig cells." Asian J Androl **14**(4): 643-8.
- Wang, X. J., T. Y. Xu, L. L. Xia, S. Zhong, X. H. Zhang, Z. W. Zhu, D. R. Chen, Y. Liu, Y. Fan, C. Xu, M. G. Zhang and Z. J. Shen (2015). "Castration impairs erectile organ structure and function by inhibiting autophagy and promoting apoptosis of corpus cavernosum smooth muscle cells in rats." Int Urol Nephrol **47**(7): 1105-15.
- Whirledge, S. and J. A. Cidlowski (2010). "Glucocorticoids, stress, and fertility." Minerva Endocrinol **35**(2): 109-25.
- Yazawa, H., I. Sasagawa, M. Ishigooka and T. Nakada (1999). "Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats." Hum Reprod **14**(7): 1806-10.
- Yiee, J. H. and L. S. Baskin (2010). "Penile embryology and anatomy." ScientificWorldJournal **10**: 1174-9.
- Yucel, C., M. Z. Keskin and C. L. Peskircioglu (2017). "The Effect of Transdermal Testosterone Administration on Lower Urinary Tract Symptoms and Erectile Dysfunction: A Prospective, Randomized, Placebo-Controlled Trial." Curr Urol **11**(1): 4-8.
- Zhou, X., A. Kudo, H. Kawakami and H. Hirano (1996). "Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development." Anat Rec **245**(3): 509-18.

APÊNDICE A – Soluções utilizadas no experimento

A - SOLUÇÃO DE BOUIN

- 70% Ácido pícrico saturado (700 mL)
- 25% Formaldeído (250 mL)
- 5% Ácido acético glacial (50 mL)

B - FORMALINA TAMPONADA

Formalina tamponada neutral (pH=7,4) de Lillie

- Formaldeído pa (40%) 100ml
- Na₂HPO₄ (Fosfato de sódio bibásico anidro pa)..... 6,5g
- NaH₂PO₄H₂O (Fosfato de sódio monobásico, pa)..... 4,0g
- Água destilada..... 900ml

* Gotejar NaOH ou HCl na solução até conseguir o pH desejado

C -PBS – solução estoque – PH 7,2

- NaCl (Cloreto de sódio) 40,0g
- KCl (cloreto de potássio) 1,0g
- NaH₂PO₄ 1,0g
- Na₂HPO₄ 5,75g
- Água destilada 1L

* Diluir 1:10 para solução de trabalho

D - PBS / BSA 0,5%

- 0,5 g de Albumina Sérica Bovina
- 100 ml PBS – Solução trabalho

APÊNDICE B. Protocolos de ensaio imunoenzimático e de histoquímica

A - MÉTODO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Análise de testosterona sérica

- Os reagentes devem atingir a temperatura ambiente antes do uso.
- Os calibradores, controles e as amostras devem ser testados em duplicata.
- Uma vez que o procedimento tenha sido iniciado, todas as etapas devem ser cumpridas sem interrupção.
- Preparar as soluções de trabalho da testosterona Livre conjugado e tampão de lavagem. Pipetar 50µl de cada amostra de controle, calibrador e amostras nos poços devidamente identificados.
- Pipetar 100µl da solução de conjugado de trabalho em cada poço.
- Agitar suavemente a placa por 10 segundos, e em seguida incubar a placa a 37 ° C durante 1 hora.
- Lavar os poços três vezes com 300µl de tampão de lavagem por poço
- Tocar a placa firmemente contra o papel absorvente, para garantir que ele esteja seco. Pipetar 150µl de substrato de Tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (TMB) para cada poço a intervalos de tempo
- Incubar a placa a 37 ° C durante 10-15 minutos (ou até que o calibrador 0 alcança a cor azul).
- Pipetar 50µl de solução de paragem em cada poço com os mesmos intervalos de tempo tal como feito com o substrato TMB.
- Ler a placa num leitor de microplaca a 450 nm dentro de 20 minutos após a adição da solução de paragem.

B – HISTOQUÍMICA

Hematoxilina e eosina

- Desparafinar em estufa à 60°C (10 minutos)
- Desparafinar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Hidratar em duas mudas de álcool absoluto (5 minutos cada)
- Hidratar em álcool 90%, 80% e 70% (3 minutos cada)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Corar em hematoxilina de Delafeld (3 minutos)
- Lavar em água corrente (3 minutos)
- Corar em solução aquosa de eosina (1 minuto)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Desidratar em álcool 70%, 80% e 90% (1 minuto cada)
- Desidratar em duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada)
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Montar com entellan e lamínula

Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação

- Desparafinar em estufa à 60°C (10 minutos)
- Desparafinar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Hidratar em álcool absoluto e 90% (3 minutos cada)
- Oxidação em Oxona (45 minutos)
- Lavar em água corrente (3 minutos)
- Desidratar em álcool 70% e 90% (3 minutos cada)
- Corar em solução de Weigert (60 minutos)
- Hidratar em álcool 90% e 70% (3 minutos cada)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Corar em solução de orange G (10 segundos)
- Lavar em água destilada (1 minuto)

- Desidratar em álcool 70%, 90% e absoluto (3 minutos cada)
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Montar com entellan e lamínula

Tricrômico de Masson

- Desparafinar em estufa à 60°C (10 minutos)
- Desparafinar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Hidratar em álcool absoluto, 90%, 80% e 70% (3 minutos cada)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Corar em solução de hematoxilina de Delafeld (2 minutos)
- Lavar em água corrente (3 minutos)
- Corar em solução de Ponceau-fucsina ácida (5 minutos)
- Lavar em água destilada (5 minutos)
- Imergir em ácido fosfomolibdico 1% (5 minutos)
- Corar em solução de azul de anilina (2 minutos)
- Imergir 2x em água acética 1% (5 minutos cada)
- Desidratar 2x em álcool absoluto (3 minutos cada)
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Montar com entellan e lamínula

APÊNDICE C. Primeiro artigo publicado.

[Downloaded free from <http://www.ajandrology.com> on Wednesday, February 28, 2018, IP: 152.92.91.93]Asian Journal of Andrology (2018) 20, 1–7
www.asiaandro.com, www.ajandrology.com

Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Male Health

Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats

Carina T Ribeiro¹, Diogo B De Souza¹, Waldemar S Costa¹, Francisco J B Sampaio¹, Marco A Pereira-Sampaio^{1,2}

The objective of this study was to investigate the effects of chronic stress on the testes of prepubertal and adult rats and to evaluate whether any alterations could be reversed when stress induction is ended. Seventy-six male rats were assigned to eight groups depending on the type of treatment (control or stressed), the age at which stress was initiated (prepubertal or adult), and the time of evaluation (immediate or late). Stress stimuli were applied for 6 weeks. Stressed prepubertal and adult rats evaluated immediately after the last stress stimulus were included in SP-I and SA-I groups, respectively. The late prepubertal (SP-L) and adult (SA-L) groups of stressed rats were evaluated 6 weeks after the last stress stimulus. Age-matched rats were used as controls (CP-I, CA-I, CP-L, and CA-L groups). Application of stress stimuli to rats in the SP-I group resulted in body weight and seminiferous tubule diameter reduction. The rats in the SA-I group also showed several functional (testosterone level and sperm parameter) and morphological (testicular weight and seminiferous tubule diameter) reductions. The rats in the SP-L group showed increased body weight and intertubular compartment volumetric and absolute densities and reduced tubular compartment volumetric density. The rats in the SA-L group presented only reduced sperm viability. Stress stimuli promoted changes in the rats in all the study groups. The testes of the adult rats were the most affected by chronic stress. However, the stressed adult rats recovered well from the testicular alterations.

Asian Journal of Andrology (2018) 20, 1–7; doi: 10.4103/aja.aja_68_17; published online: 30 January 2018

Keywords: chronic stress; morphometry; rat; testis**INTRODUCTION**

Stress may be characterized as a reactive process that triggers systemic and behavioral responses related to a set of physiological changes. This condition is important as it enables the organism to respond to different situations.¹ However, prolonged stress has a destructive effect on tissues, inhibiting several bodily activities and negatively influencing cellular proliferation and differentiation.²

Several studies have demonstrated that chronic stress leads to morphological and functional alterations in the testes. Rats subjected to chronic stress stimuli showed impaired sperm production and reduced serum testosterone levels.^{3,4} Experimental studies have also demonstrated reduced testicular weight,^{3,4} with several histological alterations^{5–8} in stressed rats.

The influence of psychosocial stress on testosterone levels and semen quality has been also demonstrated in men. Guay *et al.*⁹ found a strong association between work stress and low testosterone level. Furthermore, psychosocial stress was associated with decreased semen quality in fertile men.⁹ Male occupational stress is also associated with sperm damage⁶ and decreased number of conceptions.¹⁰ Healthy men were examined to evaluate several socio-psycho-behavioral factors in China, and psychological stress is associated with semen quality.¹¹

Despite several reports of the influence of stress stimuli on the testes, one important point has not been addressed, which is whether

recovery from testicular damage after exposure to stress stimuli is possible. Furthermore, some studies focused on prepubertal individuals, while others investigated adult individuals, but no study has compared prepubertal and adult animals subjected to the same stress stimuli.

Thus, the objectives of the present study were to evaluate the testicular alterations in prepubertal and adult Wistar rats subjected to chronic stress and to investigate whether the potential chronic stress-induced testicular alterations could be reversed after termination of the stress stimuli.

MATERIALS AND METHODS**Animals**

Seventy-six male Wistar rats were used in the experiments. The animals were allocated into two groups as follows: prepubertal rats ($n = 40$, 4 weeks old) and adult rats ($n = 36$, 10 weeks old), with mean weights of 84.8 g and 283.4 g, respectively. The rats were kept in a temperature-controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with an artificial dark-light cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.) and fed standard rat chow and water *ad libitum*. The Animal Care and Use Committee of the State University of Rio de Janeiro (Brazil) approved the handling of the animals and the study design (protocol number CEUA/004/2015).

¹Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil; ²Department of Morphology, Fluminense Federal University, Niterói, RJ 24210-150, Brazil.

Correspondence: Dr. DB De Souza (diogobenchimol@gmail.com)

Received: 20 June 2017; Accepted: 07 November 2017

Experimental design

Four groups of age-matched (prepubertal and adult) rats categorized by age were used to evaluate the immediate effects of stress stimuli at the beginning of the experiment. The SP-I group ($n = 10$) was composed of 4-week-old rats (stressed prepubertal animals killed immediately after 10 weeks of life) and the SA-I group ($n = 9$) was composed of 10-week-old rats (stressed adult animals killed immediately after 16 weeks of life); both groups were subjected to the same stress stimuli. We compared each of these groups with age-matched control groups: CP-I group ($n = 10$, control prepubertal animals killed immediately after 10 weeks of life) and CA-I group ($n = 9$, control adult animals killed immediately after 16 weeks of life) (Table 1).

The SP-I and SA-I groups were subjected to chronic stress using the immobilization method.¹² Each animal was kept in a rigid opaque plastic tube for 2 h daily to restrain its movements during the 6-week period. The plastic-restraint tubes with different diameters and lengths were adjusted weekly depending on the rats' size (Supplementary Figure 1). Meanwhile, the control groups (CP-I and CA-I) were kept under normal conditions and not subjected to any stresses. Control groups, as well as stressed groups when under stress stimuli, were deprived of food and water for 2 h per day. All the animals were killed 24 h after the last day of stress stimuli application when the rats were 10 (SP-I and CP-I) and 16 weeks old (SA-I and CA-I).

Furthermore, to investigate whether the potential changes caused by the stress stimuli were transitory or permanent, we studied four other groups. These groups were categorized by the same age used previously and subjected to the same stress stimuli protocol. However, they were evaluated much later, at 6 weeks after the end of the stress stimuli (what represents the same period that they were subjected to stress). Thus, we had the rats in the SP-L prepubertal ($n = 10$) and SA-L adult groups ($n = 9$) subjected to stress stimuli during the 6-week period (i.e., until their 10th and 16th weeks of age, respectively). These groups of rats were killed at 16 and 22 weeks of age, respectively. The two age-matched control groups, CP-L ($n = 10$) and CA-L ($n = 9$), kept under normal conditions throughout the study were used for comparison. All the animals were killed using isoflurane (Forane, Abbott Laboratories, Buenos Aires, Argentina) inhalation until cardiac arrest.

Testosterone and sperm analyses

Just before death, blood sample was collected by heart puncture for

the determination of testosterone levels using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (Cat. ADI-900-065, Enzo, New York, NY, USA; sensitivity of 5.67 pg ml⁻¹).¹³

During testicular harvest, the epididymal tail was sectioned in five fragments and homogenized in 5 ml of phosphate-buffered saline with 0.5% bovine serum albumin (A9647, bovine serum albumin, Sigma, Frederick, MD, USA) under 37°C. This homogenized solution was denominated the spermatic solution. This solution was observed in a Neubauer chamber to determine spermatozoa concentrations and motilities. In addition, sperm viability was assessed using the hypo-osmotic test;¹⁴ 200 spermatozoa per rat were evaluated blindly in different fields.¹¹

Biometrical and morphometrical analyses

The rats were weighed before they were killed; this was considered as the final body weight, expressed in grams. Both testes were dissected from their appendages, and their weights and volumes were measured by Scherle's method.¹⁵ The right testis was fixed in Bouin solution by immersion for 24 h, followed by immersion in 3.7% formaldehyde (Formaldeído, Isotar, Duque de Caxias, Brazil) for at least 48 h. Furthermore, the samples were sliced transversely and processed for paraffin embedding to obtain 5- μ m-thick histological sections. Morphometric analyses were performed in hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections using a microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) coupled with a digital camera (DP70, Olympus). All images were saved in the tagged image file format (.tiff) at a resolution of 2040 \times 1536 pixels.¹⁶

For each rat, the diameters of 125 cross sections of seminiferous tubules were measured on images obtained at $\times 100$ magnification. At least 25 fields were captured for this analysis using the straight-line tool of the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Only round-section tubules were considered, and the straight line always crossed through the center of the tubules. The seminiferous epithelium height was also measured in 125 tubules per rat using images obtained at $\times 200$ magnification. For this analysis, three equidistant lines were drawn from the tunica propria of the seminiferous tubules to the last germinative cell, thus excluding the spermatozoa. The mean of these three lines was considered as the height of that seminiferous tubule.¹⁷

The volumetric density (Vv) of each testicular structure was assessed using the point counting method.¹¹ For each rat, 25 fields randomly captured were evaluated. Briefly, using the ImageJ software, a 99-point grid was superimposed over images at $\times 400$ magnification. However, to overlay the grid, the area of the image was previously measured using the "measure" tool of the ImageJ software. Each structure touched by the grid point was counted using the "cell counter" tool of ImageJ. The density was determined as a percentage of the analyzed field. In this way, we quantified the Vv of the tunica propria, seminiferous epithelium, tubular lumen, and intertubular compartment. The sum of the Vv (tunica propria), Vv (seminiferous epithelium), and Vv (tubular lumen) was considered the Vv (tubular compartment). The points on the interstitial space were considered the Vv (intertubular compartment). For each parameter, the result was expressed as a percentage and calculated from the average of the results of each analyzed image. Furthermore, the absolute volume (Av) of each of the aforementioned structures was calculated by multiplying the testicular volume by the Vv of each structure. This parameter was expressed in milliliters. For this purpose, the following formula was used: Y (analyzed structure) volume = $(Vv [Y]/100 \times \text{testicular volume})$.

The protocols used for morphometrical analyses are presented in a Supplementary Document 1 and illustrated in Supplementary Figure 2.

Table 1: Experimental groups

Group name	Description
Control groups	
CP-I	Control animals aged 4 weeks (prepubertal) included in the immediate group
CA-I	Control animals aged 10 weeks (adult) included in the immediate group
CP-L	Control animals aged 4 weeks (prepubertal) included in the late group
CA-L	Control animals aged 10 weeks (adult) included in the late group
Stress groups	
SP-I	Animals subjected to chronic stress from 4 weeks of age (prepubertal), killed immediately after 10 weeks of life
SA-I	Animals subjected to chronic stress from 10 weeks of age (adult), killed immediately after 16 weeks of life
SP-L	Animals subjected to chronic stress from 4 weeks of age (prepubertal), killed immediately after 16 weeks of life
SA-L	Animals subjected to chronic stress from 10 weeks of age (adult), killed immediately after 22 weeks of life



Statistical analysis

All parametric values were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov normality test, and all sample data were normally distributed (Gaussian distribution). The mean values in each group of rats subjected to stress stimuli were compared with those of the corresponding control group using the Student's *t*-test. All analyses were performed with the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Mean differences were considered significant when $P < 0.05$. All results are presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS**Immediate effects of stress stimuli on the testes**

Serum testosterone levels were altered only in the animals subjected to chronic stress in adulthood. The SA-I group showed a decrease of 21% in testosterone levels in comparison with the CA-I group ($8.83 \pm 1.53 \text{ ng ml}^{-1}$ vs $11.25 \pm 2.14 \text{ ng ml}^{-1}$, $P = 0.04$). These data are represented in **Figure 1**. No significant difference in serum testosterone level was observed between the SP-I and CP-I groups ($11.93 \pm 1.21 \text{ ng ml}^{-1}$ vs $13.00 \pm 1.67 \text{ ng ml}^{-1}$; $P = 0.23$).

Spermatic changes were found only in the animals subjected to stress in adulthood. Sperm motility decreased by 19% in the SA-I group (43.4% \pm 10.1%) as compared with that in the CA-I group (54.1% \pm 5.0%). Furthermore, sperm viability was reduced by 46% in the SA-I group (8.8% \pm 2.3%) as compared with that in the CA-I group (16.4% \pm 3.6%). No significant differences in the evaluated sperm parameters were observed between the SP-I and CP-I groups. All sperm-related analysis results are listed in **Table 2**.

The final body weight was reduced by 14% in the SP-I group (177 \pm 15.8 g) as compared with that in the CP-I group (206 \pm 11.0 g), different from that of the animals subjected to chronic stress in adulthood, where the final body weights did not show a significant difference between the groups SA-I and CA-I. On the other hand, the testicular weights and volumes both reduced by 12% in the SA-I group (1.65 \pm 0.17 g and 1.69 \pm 0.17 ml, respectively) as compared with those in the CA-I group (1.87 \pm 0.23 g and 1.93 \pm 0.10 ml, respectively), different from those in the SP-I and CP-I groups, where no significant difference in the testicular weights and volumes was found.

The SP-I group showed a seminiferous tubule diameter of $282 \pm 10.3 \mu\text{m}$, which was reduced by 4%, when compared with that in the CP-I group ($293 \pm 3.7 \mu\text{m}$, **Figure 2**). However, no significant differences in all the other morphometric parameters analyzed were found between the groups. All the biometrical and morphometrical data of the rats in the SP-I and CP-I groups are listed in **Table 3**. The immediate effects of chronic stress on testicular morphology induced

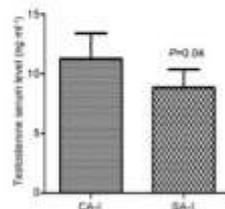


Figure 1: The effects of chronic stress stimuli on the serum testosterone levels in the adult group, showing alterations immediately after the end of stress stimuli. The stressed adult group evaluated immediately after the end of stress stimuli showed a decrease of 21% in testosterone levels in comparison with the control adult group. Data are expressed as the mean \pm standard deviation. CA-I: adult rats of control group immediately analyzed; SA-I: adult rats of stress group immediately analyzed.

more changes when it occurred in adulthood. The seminiferous tubule diameter was reduced by 6% in the SA-I group ($286 \pm 14.1 \mu\text{m}$) as compared with that in the CA-I group ($305 \pm 8.7 \mu\text{m}$). The seminiferous epithelium Vv of the rats in the SA-I group (54.6% \pm 1.4%) increased by 9% as compared with that of the rats in the CA-I group (50.3% \pm 1.9%). The tubular lumen Vv (31.8% \pm 1.2%) and Av ($0.5 \pm 0.1 \text{ ml}$) in the SA-I group decreased by 11% and 17%, respectively, as compared with those (35.8% \pm 2.2% and $0.6 \pm 0.1 \text{ ml}$, respectively) in the control groups. No significant differences in the other morphometrical parameters analyzed were found between the groups. All biometrical and morphometrical data of the SA-I and CA-I groups are listed in **Table 3**.

Late effects of stress stimuli on the testes

The animals subjected to chronic stress before puberty and in adulthood did not show significant changes in serum testosterone level, when assessed 6 weeks after the end of the stress stimuli. The serum testosterone levels of the SP-L and the CP-L groups were 11.85 ± 1.91 and $12.03 \pm 2.59 \text{ ng ml}^{-1}$, respectively ($P = 0.89$). The SA-L and CA-L groups presented serum testosterone levels of 12.59 ± 2.17 and $10.08 \pm 2.43 \text{ ng ml}^{-1}$, respectively ($P = 0.10$).

As in the SP-I and CP-I groups, the animals of groups SP-L and CP-L also did not show any significant changes in semen. However, sperm viability was reduced by 24% in the SA-L group (15.9% \pm 3.2%) as compared with that in the CA-L group (21.1% \pm 3.6%). All sperm-related analysis results are listed in **Table 2**.

The final body weight increased by 14% in the SP-L group (378 \pm 35.2 g) as compared with that in the CP-L group (331 \pm 23.9 g). These data are listed in **Table 3**. No significant differences were found in the final body weight analyses between the SA-L and CA-L groups. All biometrical and morphometrical data of the SA-L and CA-L groups are listed in **Table 3**. Regarding the testicular weights and volumes, no significant differences were observed between the groups.

Different from the rats evaluated immediately after the stress period, the animals assessed 6 weeks after the last stress stimulus showed significant morphological changes only between the SP-L and the CP-L groups. Tubular compartment Vv decreased by 2% in the stressed group (91.2% \pm 0.7%) as compared with the control group (92.5% \pm 0.9%). By contrast, the Vv and Av of the intertubular compartment increased by

Table 2: Effect of chronic stress on sperm concentration and motility and viability of rats stressed before puberty or in the adulthood

	Control group	Stress group	P
Prepubertal - immediate			
Concentration ($\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)	1.3 \pm 0.7	1.1 \pm 0.8	0.72
Motility (%)	49.5 \pm 12.5	39.8 \pm 21.7	0.24
Viability (%)	12.0 \pm 4.0	11.0 \pm 2.2	0.54
Adult - immediate			
Concentration ($\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)	2.2 \pm 1.5	1.8 \pm 1.5	0.20
Motility (%)	54.1 \pm 5.0	43.4 \pm 10.1	0.01
Viability (%)	16.4 \pm 3.6	8.8 \pm 2.3	<0.01
Prepubertal - late			
Concentration ($\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)	1.4 \pm 0.2	1.1 \pm 0.5	0.20
Motility (%)	52.9 \pm 8.9	46.9 \pm 12.5	0.32
Viability (%)	10.3 \pm 3.8	9.0 \pm 4.8	0.55
Adult - late			
Concentration ($\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)	1.6 \pm 1.2	1.6 \pm 0.8	1.00
Motility (%)	31.8 \pm 14.3	30.1 \pm 9.4	0.78
Viability (%)	21.1 \pm 3.6	15.9 \pm 3.2	<0.01

Data expressed as mean \pm s.d.; s.d.: standard deviation



Table 3: Biometrical and morphometrical data of prepubertal and adult rats submitted to chronic stress

	CP-I	SP-I	P	CA-I	SA-I	P	CP-L	SP-L	P	CA-L	SA-L	P
Final body weight (g)	206±11.0	177±15.8	<0.01	353±32.8	342±28.3	0.86	331±23.9	378±35.2	<0.01	406±46.3	395±31.0	0.56
Testicular weight (g)	1.7±0.1	1.7±0.1	0.31	1.9±0.2	1.6±0.2	<0.01	1.9±0.1	1.8±0.1	0.06	1.8±0.2	1.8±0.1	0.31
Testicular volume (ml)	1.8±0.1	1.7±0.2	0.51	1.9±0.1	1.7±0.2	<0.01	1.9±0.1	1.8±0.1	0.62	1.8±0.2	1.8±0.1	0.81
Seminiferous epithelium height (µm)	55.1±1.1	53.6±2.6	0.19	51.6±0.2	51.3±3.5	0.87	56.5±2.3	55.8±1.8	0.45	51.7±2.1	51.2±1.9	0.64
Seminiferous tubule diameter (µm)	293±3.7	282±10.3	0.02	305±8.7	286±14.1	<0.01	290±7.3	291±12.2	0.79	302±6.3	300±4.9	0.38
Seminiferous epithelium Vv (%)	54.2±1.3	55.8±4.5	0.37	50.3±1.9	54.6±1.4	<0.01	57.9±2.5	57.9±1.4	0.95	53.4±1.6	52.8±1.1	0.38
Tunica propria Vv (%)	3.4±0.5	3.7±0.6	0.37	3.6±0.4	3.4±0.6	0.55	2.9±0.5	2.7±0.7	0.32	3.9±0.6	3.8±0.5	0.55
Tubular lumen Vv (%)	32.2±1.7	30.8±5.3	0.50	35.8±2.2	31.8±1.2	<0.01	31.7±2.8	30.6±1.9	0.34	32.4±1.6	33.8±1.6	0.08
Tubular compartment Vv (%)	89.9±1.4	90.3±1.6	0.57	89.7±1.4	89.8±1.1	0.85	92.5±0.9	91.2±0.7	<0.01	89.8±1.8	90.4±0.9	0.35
Intertubular compartment Vv (%)	10.0±1.4	9.6±1.6	0.57	10.2±1.4	10.1±1.1	0.85	7.4±0.9	8.7±0.7	<0.01	10.1±1.8	9.5±0.9	0.35
Seminiferous epithelium Av (ml)	0.9±0.1	1.0±0.1	0.26	0.9±0.1	0.9±0.1	0.68	1.1±0.1	1.1±0.1	0.55	1.0±0.1	1.0±0.1	0.70
Tunica propria Av (ml)	0.05±0.01	0.06±0.01	0.38	0.06±0.01	0.05±0.01	0.24	0.05±0.01	0.05±0.01	0.44	0.07±0.01	0.06±0.01	0.59
Tubular lumen Av (ml)	0.6±0.1	0.5±0.1	0.61	0.6±0.1	0.5±0.1	0.02	0.6±0.1	0.6±0.1	0.82	0.6±0.1	0.6±0.1	0.49
Tubular compartment Av (ml)	1.6±0.2	1.6±0.2	0.99	1.6±0.2	1.5±0.1	0.30	1.7±0.1	1.7±0.2	0.65	1.6±0.2	1.6±0.1	0.96
Intertubular compartment Av (ml)	0.17±0.03	0.16±0.03	0.59	0.18±0.02	0.17±0.02	0.33	0.13±0.01	0.16±0.02	0.01	0.17±0.02	0.17±0.02	0.95

Data expressed as mean±s.d. s.d.: standard deviation; Vv: volumetric density; Av: absolute volume; CP-I: prepubertal rats of control group immediately analyzed; CA-I: adult rats of control group immediately analyzed; CP-L: prepubertal rats of control group lately analyzed; CA-L: adult rats of control group lately analyzed; SP-I: prepubertal rats of stress group immediately analyzed; SA-I: adult rats of stress group immediately analyzed; SP-L: prepubertal rats of stress group lately analyzed; SA-L: adult rats of stress group lately analyzed

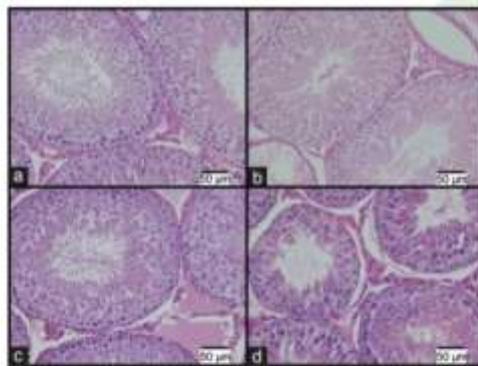


Figure 2: Photomicrographs of the cross section of seminiferous tubules. The images on the top row (a and b) are from the prepubertal group and those on the bottom row (c and d) are from the adult group, the analysis results of both samples were collected immediately after the end of stress stimuli. The images (a) and (c) are from the control groups. The images (b) and (d) are from the stressed groups (H&E; ×400). Scale bars = 50 µm.

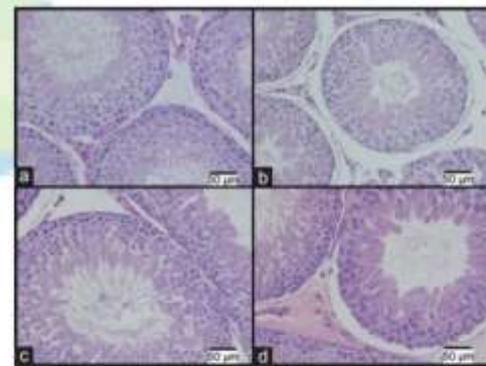


Figure 3: Photomicrographs of a cross section of seminiferous tubules. The images on the top row (a and b) are from the prepubertal groups and those on the bottom row (c and d) are from the adult groups, both showing alterations occurring 6 weeks after the end of the stress stimuli. The images (a) and (c) are from the control groups. The images (b) and (d) are from the stressed groups (H&E; ×400). Scale bars = 50 µm.

18% and 23%, respectively, in the SP-L group ($8.7\% \pm 0.7\%$ and 0.16 ± 0.02 ml, respectively) as compared with those in the CP-L group ($7.4\% \pm 0.9\%$ and 0.13 ± 0.01 ml, respectively). No significant difference in testicular morphology was observed between the SA-L and CA-L groups. Histological fields are presented in **Figure 3**.

DISCUSSION

Testicular morphology and function depend on adequate microenvironment-related conditions such as adequate temperature, blood supply, and hormonal stimulation.^{17,18} Stress, especially when it is repeated or chronic, activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which in turn affects the function of the hypothalamic-pituitary-gonadal

axis. Consequently, this mechanism reduces the amount of sex hormones (testosterone and estrogen) in stressed individuals.¹⁹

As the testes are the main producers of testosterone, which is essential to maintain regular testicular function, morphological and functional alterations are expected in the testes of stressed individuals. This is the first study to assess the immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats.

In this study, chronic stress was more harmful when it occurred in adulthood and was evaluated immediately. For example, serum testosterone levels decreased only in the adult rats subjected to stress stimuli, but in a long-term evaluation, the serum testosterone

levels were normal. Chronic stress increases glucocorticoid levels,²⁰ thereby suppressing the release of gonadotropins and acting directly on Leydig cell receptors, inhibiting testosterone biosynthesis.²¹ This could explain the low levels of the male sex hormone in the stressed adult rats and the recovery of the serum testosterone levels in the adult animals when testosterone biosynthesis was not inhibited anymore.

Changes in such sperm parameters as viability and motility were found only in the rats subjected to chronic stress stimuli in adulthood. This could be explained by their low serum testosterone levels, as the hormone is important for spermatogenesis and spermogenesis.²² By contrast, the study by Nirupama *et al.*²³ demonstrated alterations in sperm concentrations in adult rats subjected to stress for 60 days. Probably, changes in sperm concentration only become conspicuous after longer periods of stress. Although the stress induced in the adult rats in this study was not enough to reduce sperm concentration, it reduced sperm motility (19%) and viability (46%) in SA-I group when evaluated immediately after the last stress stimulus was applied, enough to impair the reproductive function.

In addition, the greatest morphological change in the seminiferous tubules was found in the SA-I group. Besides the altered parameters of the seminiferous tubules, the testicular weight and volume were reduced, suggesting atrophy of the organ. This clearly demonstrated that the effects of chronic stress were more pronounced in the adult rats.

On the other hand, the prepubertal rats subjected to chronic stress and evaluated immediately after the end of the stress stimuli showed a significant decrease in body weight. Although the rats subjected to stress stimuli were unable to access food and water for 2 h per day, the control groups were also subjected to this restriction during the same period. The weight loss in the stressed rats during puberty was demonstrated in earlier studies.¹² The higher energy expenditure in stress situations may explain the weight loss.²⁴ The weight loss indicated that other organs could be affected by the chronic stress, as shown by the reduced diameters of the seminiferous tubules in the rats subjected to chronic stress.

Chronic stress conditions during childhood can lead to depression and anxiety, as well as obesity and metabolic syndrome.²⁵ In addition, children and adolescents with increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity have greater weight gain in adulthood.^{25,26} Chronic stress causes different and permanent (systemic and testicular) changes in adulthood when applied before puberty. These rats had elevated body weights, indicating a tendency for obesity in the future.

The chronic stress applied before puberty resulted in important testicular changes, with late alterations in adulthood. Morphological changes were found in the assessment performed 6 weeks after the end of the stress stimuli, but no alteration was found immediately after the last stress stimulus was applied. For example, the space occupied by the interstices increased, while the space occupied by the tubular compartments decreased only when these parameters were evaluated later.

The results of the present study highlight the extreme importance of avoiding stress stimuli in prepubertal rats, as rats exposed to chronic stress before puberty developed a significant reduction in the tubular compartment Vv and an increase in the intertubular compartment Vv when evaluated 6 weeks after the last stress stimulus was applied. As the testes did not present volume and weight alterations, the tubular compartment of the animals seemed reduced, suggesting that a late effect of chronic stress could cause a functional impairment in the future. No study has investigated the effects of chronic stress on reproductive function in prepubescent men. However, Almeida *et al.*¹⁷ showed that rats subjected to stress stimuli by immobilization before puberty had reduced fertility. Although stress is more intense than that

applied in our work, our results reinforce the idea that changes caused by chronic stress before puberty may be more permanent. Based on the morphological alterations in the testes of the prepubertal rats, we can suppose that testicular damage would be more permanent if chronic stresses occur in childhood.

The rats subjected to chronic stress in adulthood showed several changes in testicular morphology, spermatid parameters, and serum testosterone levels when evaluated just after the end of the stress stimuli. However, only sperm viability was reduced when the rats were assessed late. Moreover, the reduction in sperm viability was higher (46%) in the rats evaluated immediately after termination of the stress stimuli than in the rats evaluated late (24%). Therefore, the effects of chronic stress stimuli in adult rats were almost completely reversible after interruption of the stimulus. Some changes in spermatozoa production have been reported even 4 months after the interruption of the stress stimulus.¹⁷

Although chronic stress promoted significant alterations in the testicular parameters in the adult rats, the testes recovered almost completely after the end of the stress stimulus. Such results could stimulate a change of routine activities in men with fertility problems who live a stressful life. Although the stress in rats and men are not the same, men with stressful lifestyles are more prone to fertility problems.²⁸ A report indicated that paternal stress at work is associated with a decrease in the number of conceptions.²⁸ Our result suggests that withdrawal of stress factors in men may improve fertility, and this could be an important factor to consider in the treatment of infertility.

More studies on the subject area are necessary, as the present study had a few limitations. The study was performed in an animal model within controlled experimental conditions, so the results of this study may not represent the events that occur in stressed men. Furthermore, testicular alterations may vary according to the type, intensity, and duration of the stress stimulus, besides the age of the individual. Thus, the differences related to these factors may explain the divergences presented between our results and other reports from the literature.

CONCLUSION

The results of the present study showed that chronic stress induced before or after puberty led to testicular alterations in rats. Nevertheless, the changes were more significant when the stress stimuli were induced in adulthood; however, the alterations identified in the rats stressed during adulthood may almost completely reverse after the end of the stress-inducing stimuli. On the other hand, in the rats stressed before puberty, testicular alterations appeared to be more permanent and seemed to increase even after the end of the stress stimuli.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CTR contributed to the research design; performed the experiments, data acquisition, analysis, and interpretation of data and drafted the manuscript. DBDS contributed to the research design; performed the analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. WSC and FJBS contributed to the research design and revised the manuscript. MAPS contributed to the research design; performed the analysis and interpretation of data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

All authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), the Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES), and the National Council for Scientific and



Technological Development (CNPq). These foundations had no involvement in the study design, data collection, analysis, and interpretation, drafting of the manuscript, and decision to submit for publication.

Supplementary information is linked to the online version of the paper on the *Asian Journal of Andrology* website.

REFERENCES

- Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, Barcellos Sampaio FJ, Silva Costa W, *et al*. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res* 2011; 34: 424-9.
- Rosmond R, Bjorntorp P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity as a predictor of cardiovascular disease, type 2 diabetes and stroke. *J Intern Med* 2000; 247: 188-97.
- Garcia-Diaz EC, Gomez-Quiroz LE, Arenas-Rios E, Aragon-Martinez A, Ibarra-Arias JA, *et al*. Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61: 15D-60.
- Priya PH, Reddy PS. Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2012; 317: 455-65.
- Hou G, Xiong W, Wang M, Chen X, Yuan TF. Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats. *J Sex Med* 2014; 11: 653-63.
- Wang FF, Wang Q, Chen Y, Lin Q, Gao HB, *et al*. Chronic stress induces ageing-associated degeneration in rat Leydig cells. *Asian J Androl* 2012; 14: 643-8.
- Guay A, Seftel AD, Traish A. Hypogonadism in men with erectile dysfunction may be related to a host of chronic illnesses. *Int J Impot Res* 2010; 22: 9-19.
- Gollenberg AL, Liu F, Brazil C, Drobnis EZ, Guzik D, *et al*. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril* 2010; 93: 1104-11.
- Jurewicz J, Radwan M, Mercz-Kot D, Sobala W, Ligocka D, *et al*. Occupational, life stress and family functioning: does it affect semen quality? *Ann Hum Biol* 2014; 41: 220-8.
- Lee MS, Paek D, Eum KD, Siegrist J, Li J, *et al*. Paternal work stress and prolonged time to pregnancy. *Int Arch Occup Environ Health* 2009; 82: 209-16.
- Li Y, Zhou N, Han X, Ma M, Li L, *et al*. Socio-psychological factors associated with male semen quality in China: results from 1346 healthy men in Chongqing. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2013; 39: 102-10.
- de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl* 2012; 33: 735-9.
- Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, *et al*. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol* 2014; 191: 1578-84.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-28.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26: 57-60.
- Ribeiro CT, De Souza DB, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. Effects of testicular torsion on seminiferous tubule morphology and sperm parameters of prepubertal, pubertal, and adult rats. *Theriogenology* 2015; 84: 1142-8.
- Damber JE, Janson PO. The influence of scrotal warming on testicular blood flow and endocrine function in the rat. *Acta Physiol Scand* 1978; 104: 61-7.
- Shalet SM. Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53: 285-8.
- Toufexis D, Rivarola MA, Lara H, Viau V. Stress and the reproductive axis. *J Neuroendocrinol* 2014; 26: 573-86.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 397-409.
- Lin H, Yuan KM, Zhou HY, Bu T, Su H, *et al*. Time-course changes of steroidogenic gene expression and steroidogenesis of rat Leydig cells after acute immobilization stress. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 21028-44.
- O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology* 1994; 135: 2608-14.
- Nirupama M, Devaki M, Nirupama R, Yajurvedi HN. Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J Physiol Biochem* 2013; 69: 59-68.
- Goldstein DS. Adrenal responses to stress. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 1433-40.
- Parvanidou P, Chrousos GP. Stress and obesity/metabolic syndrome in childhood and adolescence. *Int J Pediatr Obes* 2011; 6 Suppl 1: 21-8.
- Anderson SE, Cohen P, Naumova EN, Must A. Association of depression and anxiety disorders with weight change in a prospective community-based study of children followed up into adulthood. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006; 160: 285-91.
- Armeida SA, Kempinas WG, Lamano Carvalho TL. Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 1105-9.
- Nortrop L, Jensen TK, Hansen AM, Lassen TH, Bang AK, *et al*. Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. *Fertil Steril* 2016; 105: 174-87.e1-2.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

©The Author(s)(2018)



SUPPLEMENTARY DOCUMENT 1

Seminiferous tubule diameter

1. Analyzed diameter of 125 seminiferous tubules in each testicle (5 tubules in 5 fields of 5 cuts) was measured
2. Images were captured under $\times 100$ magnification
3. ImageJ software for analysis
4. Open the tool file and after that, open the ruler with the same resolution and size of the image captured for calibration
5. Open the image file to be analyzed
6. Open the straight line tool
7. Use the straight line tool, drawing a line from the tunica propria of one pole to the other of the tubule passing through the center of the tubule. The result of the analysis of each testicle was considered to be mean of the 125 diameters measured, expressed in μm .

Seminiferous epithelium height

1. Analyzed diameter of 125 seminiferous tubules in each testicle (5 tubules in 5 fields of 5 cuts) was measured
2. Images were captured under $\times 200$ magnification
3. ImageJ software for analysis
4. Open the tool file and after that, open the ruler with the same resolution and size of the image captured for calibration
5. Open the image file to be analyzed
6. Open the straight line tool
7. Draw three lines (using the same tool used for the diameter) that extend from the tunica propria to the lumen of the seminiferous tubule, excluding spermatozoa. Therefore, here we do not consider the spermatozoa as cells that make up the epithelium seminiferous. The three lines were distributed in such a way that they were equidistant. The average of these three lines was considered as the height of the epithelium of that seminiferous tubule.

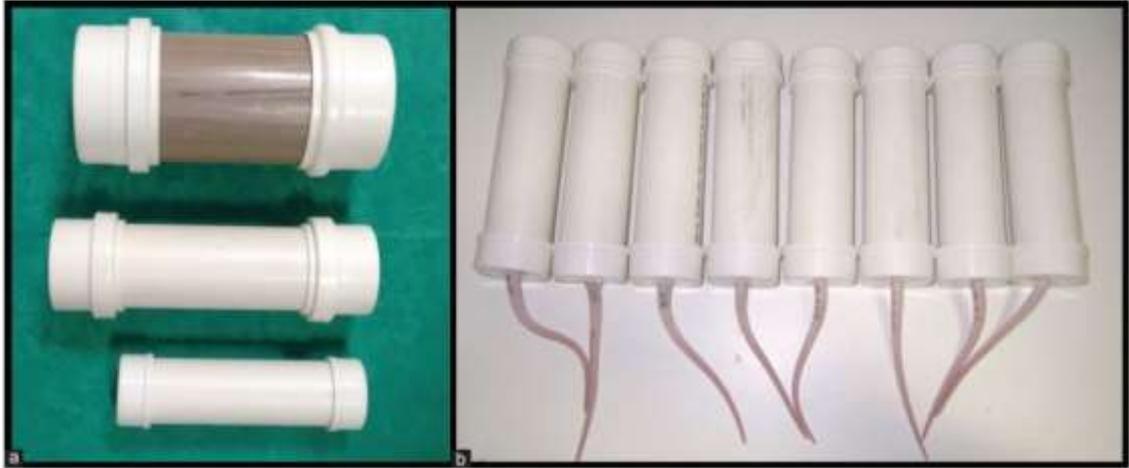
Volumetric density protocol

1. 25 fields randomly captured were analyzed for each rat
2. Images were captured under $\times 400$ magnification
3. ImageJ software for analysis
4. Open the image file to be analyzed, and measure its area in pixels by choosing "measure" in the "analyze" bar.
5. Open the plugin "Grid" and insert the measured area of the image and choose grid type: crosses - **Supplementary Figure 2**
6. Open the plugins analyze cell counter. With the tool "cell counter," each structure touched by a point was counted, and its density was determined as a percentage of the analyzed field
7. We quantified the Vv of the tunica propria, seminiferous epithelium, tubular lumen, and intertubular compartment. The sum of the Vv (tunica propria), Vv (seminiferous epithelium), and Vv (tubular lumen) was considered the Vv (tubular compartment)
8. The Vv of the interstitial space was considered as the intertubular compartment
9. For each parameter, the result was expressed as a percentage and calculated by the average of the results of each analyzed image
10. Further, the absolute volume (Av) of each structures mentioned was calculated by multiplying the testicular volume by each structure's Vv. This parameter was expressed in milliliters. For this, the following formula was used:

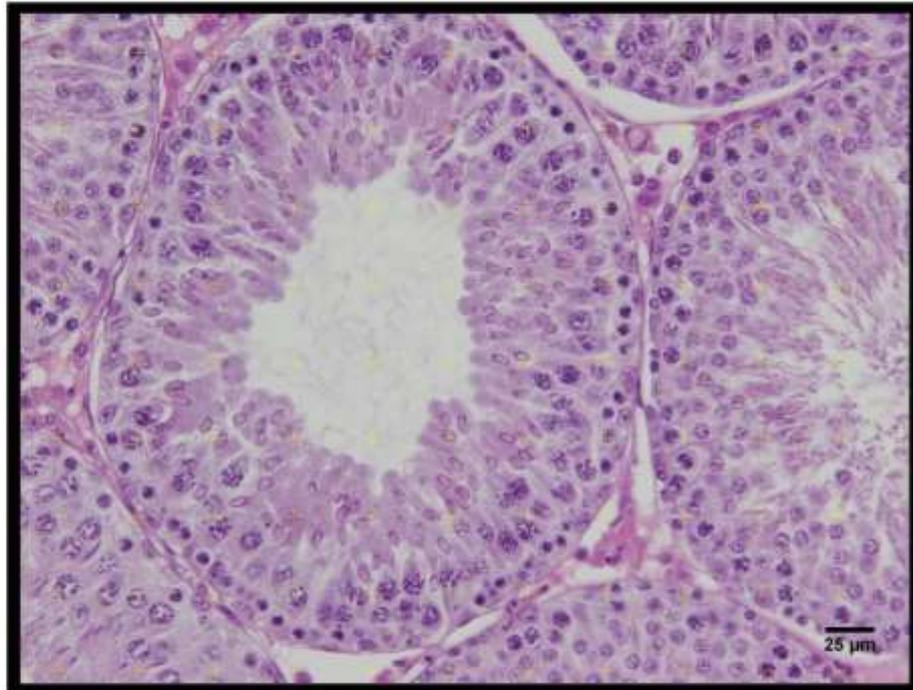
$$Y \text{ (analyzed structure) volume} = (Vv [Y]/100) \times \text{testicular volume}$$



[Downloaded free from <http://www.ajandrology.com> on Wednesday, February 28, 2018, IP: 152.92.91.93]



Supplementary Figure 1: (a) Rigid opaque plastic tubes of different diameters and lengths used to restrain rats to induce chronic stress by the immobilization method. (b) Animals inside the tubes (with tails outside). Each animal was kept in these tubes for 2 h daily to restrain its movements leading to a chronic stress.



Supplementary Figure 2: Testicular histological field, captured under x400 magnification, with a 99-point grid superimposed to assess the volumetric density of each testicular structure.

APÊNDICE D. Segundo artigo submetido

PLOS ONE

Evaluation of immediate and late effects of chronic stress in the corpora cavernosa of prepubertal and adult rat penis
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Evaluation of immediate and late effects of chronic stress in the corpora cavernosa of prepubertal and adult rat penis
Short Title:	Effects of chronic stress in the penis
Corresponding Author:	Diogo B. De Souza, Ph.D. State University of Rio de Janeiro Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Keywords:	Erectile dysfunction; Morphometry; Penis; Stress.
Abstract:	<p>Aim The objective of this study was evaluate the immediate and late effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of prepubertal and adult rats.</p> <p>Method Male rats were randomly assigned into 8 groups: The prepubertal (4 weeks old) and adult (10 weeks old) animals were immobilized in arigid cylinder, 2 h daily, during 6 weeks to simulate stresssituation. Ten prepubertal and nine adult rats were killed 24 h after the last stress session, for immediate evaluation, while ten prepubertal and nine adult rats were killed 6 weeks after the last stress session, for late evaluation. Other age-matched animals were used as control groups. Were analyzed serum testosterone and the mid-shaft penis. We analyzed cross-sectional corpus cavernosum (with and without tunica albuginea) area, the area of tunica albuginea, and the surface densities of connective tissue, smooth muscle and sinusoidal spaces. Also, were analyzed to evaluate the elastic system fibers. Student's-t-test was used for this purpose, considering $P < 0,05$ significant.</p> <p>Results There was a 11.5% and 16% reduction on the corpus cavernosum area (with and without tunica albuginea, respectively) in group SA-I, in comparison to CA-I. There was a 48% and 59% reduction of the smooth muscle and elastic system fibers surface density, respectively, and an increase of 5.5% of collagen surface density in group SA-I, in comparison to CA-I. The area of tunica albuginea in the animals of group SA-L was 14% higher than their controls. In SA-I group there was alterations in testosterone levels, with a decrease of 21% compared to the CA-I. Also, there was reduction of 48% of the elastic system fibers surface density in group SP-L when compared to the CP-L.</p> <p>Conclusion: The chronic stress promotes morphological alteration in the penis of rats. These alterations were more important when the stress occurred in the adulthood.</p>
Order of Authors:	<p>Carina T Ribeiro</p> <p>Marcello Duarte</p> <p>Waldemar S Costa</p> <p>Francisco J Sampaio</p> <p>Marco A Pereira-Sampaio</p> <p>Diogo B. De Souza, Ph.D.</p>
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES), and the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

<p>Please describe all sources of funding that have supported your work. This information is required for submission and will be published with your article, should it be accepted. A complete funding statement should do the following:</p> <p>Include grant numbers and the URLs of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding.</p> <p>Describe the role of any sponsors or funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If the funders had no role in any of the above, include this sentence at the end of your statement: "<i>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</i>"</p> <p>However, if the study was unfunded, please provide a statement that clearly indicates this, for example: "<i>The author(s) received no specific funding for this work.</i>"</p> <p>* typeset</p>	<p>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript</p>
<p>Competing Interests</p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.</p> <p>Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests)?</p> <p>If yes, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: <i>I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:</i></p> <p>If no authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: "<i>The authors have</i></p>	<p>The authors have declared that no competing interests exist.</p>

<p>declared that no competing interests exist."</p> <p>* typeset</p>	
<p>Ethics Statement</p> <p>You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or vertebrate animals, embryos or tissues. All information entered here should also be included in the Methods section of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.</p> <p>Human Subject Research (Involved human participants and/or tissue)</p> <p>All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.</p> <p>Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.</p> <p>Animal Research (Involved vertebrate animals, embryos or tissues)</p> <p>All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research." The relevant guidelines followed and the committee that approved</p>	<p>All experiments were performed according to national and international laws for the scientific use of animals. This project was also approved by the local ethics committee.</p>

<p>the study should be identified in the ethics statement.</p> <p>If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.</p> <p>Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.</p> <p>Field Permit</p> <p>Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.</p>	
<p>Data Availability</p> <p>PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the PLOS Data Policy and FAQ for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.</p> <p>Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.</p> <p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>
<p>Please describe where your data may be found, writing in full sentences. Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is</p>	<p>All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.</p>

<p>accepted. If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of XXX with the appropriate details.</p> <p>If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, "All relevant data are within the paper and its Supporting Information files."</p> <p>If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below. If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:</p> <p>"Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data."</p> <p>"Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX."</p> <p>* typeset</p>	
Additional data availability information:	

Cover Letter



STATE UNIVERSITY of RIO de JANEIRO
Biomedical Center - School of Medicine
Urogenital Research Unit

Av. 28 de Setembro, 87 - fundos - FCM - terreo, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Tel: + 55 21 2868-8021

Website: www.urogenitalresearch.org

March 02, 2018

Dear Editor,

Please, find the Research Article on "**Evaluation of immediate and late effects of chronic stress in the corpora cavernosa of prepubertal and adult rat penis**" for considering to publication in the Plos ONE.

As authors, we have made contribution to the material submitted herein. We have read and approved the final manuscript and have no substantial direct or indirect financial support in conjunction with this publication. We further add that the manuscript brings original information which was not previously presented (except abstract) and is not under submission for publication elsewhere. In consideration of the Editor of Plos ONE, taking action in reviewing and editing this submission, the authors hereby transfer, assign or otherwise convey all copyright ownership in the event that such work is publish in that Journal. We have read and comply with the requirements set forth in Information for Authors.

Sincerely,

Diogo B. de Souza, Ph.D.

1 **Evaluation of immediate and late effects of chronic stress in the corpora cavernosa**
2 **of prepubertal and adult rat penis**

3

4 Carina T. Ribeiro^{1*}, Marcello Duarte^{1*}, Waldemar S. Costa^{1&}; Francisco J. B.
5 Sampaio^{1&}; Marco A. Pereira-Sampaio^{1,2*}Diogo B. De Souza^{1,5*}

6

7

8 1 - Urogenital Research Unit, Rio de Janeiro StateUniversity, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

9 2 - Department of Morphology, Fluminense Federal University, Niteroi, RJ, Brazil

10

11

12 Running title: Effects of chronic stress in the penis

13

14

15 *Corresponding author

16 E-mail: diogobenchimol@gmail.com

17

18 *These authors contributed equally to this work.

19 &These authors also contributed equally to this work.

20

21

22 **Abstract**

23

24 **Aim**

25 The objective of this study was evaluate the immediate and late effects of chronic stress
26 on penile corpus cavernosum of prepubertal and adult rats.

27 **Method**

28 Male rats were randomly assigned into 8 groups: The prepubertal (4 weeks old)and
29 adult (10 weeks old) animals were immobilized in arigid cylinder, 2 h daily, during 6
30 weeks to simulate stresssituation. Ten prepubertal and nine adult rats were killed 24 h
31 after the last stress session, for immediate evaluation, while ten prepubertal and nine
32 adult rats were killed 6 weeks after the last stress session, for late evaluation.Other age-
33 matched animals were used as control groups.Were analyzed serum testosterone and the
34 mid-shaft penis. We analyzed cross-sectional corpus cavernosum (with and without
35 tunica albuginea) area, the area of tunica albuginea, and the surface densities of
36 connective tissue, smooth muscle and sinusoidal spaces. Also, were analyzed to
37 evaluate the elastic system fibers. Student´s-t-test was used for this purpose, considering
38 $P<0.05$ significant.

39 **Results**

40 There was a 11.5% and 16% reduction on the corpus cavernosum area (with and
41 without tunica albuginea, respectively) in group SA-I, in comparison to CA-I. There
42 was a 48% and 59% reduction of the smooth muscle and elastic system fibers surface
43 density, respectively, and an increase of 5,5% of collagen surface density in group SA-
44 I, in comparison to CA-I. The area of tunica albuginea in the animals of group SA-L

45 was 14% higher than their controls. In SA-I group there was alterations in testosterone
46 levels, with a decrease of 21% compared to the CA-I. Also, there was reduction of 48%
47 of the elastic system fibers surface density in group SP-L when compared to the CP-L.

48 **Conclusion:** The chronic stress promotes morphological alteration in the penis of rats.
49 These alterations were more important when the stress occurred in the adulthood.

50

51 **Key words:** Erectile dysfunction;Morphometry; Penis; Stress.

52

53

54 **Introduction**

55

56 Recently, penile erection failures were reported in men who have a stressful
57 routine(1, 2). Some conditions that are commonly preceded by stressful events, such as
58 anxiety disorders and depression, increase the risk of erectile dysfunction(3, 4).Children
59 and teenagers also suffer from stress, mainly of psychogenic origin(5, 6). However,
60 there is no study associating stress in childhood or youth with impairment in sexual
61 function.

62 Penile erection involves a complex neuroendocrine, vascular and structural
63 mechanism. Basically, the erection occurs by cavernosal sinusoidal smooth muscle
64 distend, with subsequent increased arterial blood flow and venous occlusion(7).
65 Therefore, impairment of any of these factors can result in erectile dysfunction. It was
66 reported that chronic stress in rats reduces testosterone levels(8), and this hormone plays
67 an important role in the modulation and maintenance of penile structures, as well as in
68 the neuroendocrine and vascular mechanism for erectile function(9). Structural changes,
69 such as smooth muscle reduction, increased fibrosis, and endothelial and nerve
70 dysfunctions in the penile corpus cavernosum were associated with suppression of
71 testosterone in men and laboratory animals(10-12). It is also known that these changes
72 are correlated with erectile dysfunction(7, 13, 14).

73 Although chronic stress is clinically associated with erectile dysfunction, few
74 experimental studies have evaluated the effects of stress on the penile corpus
75 cavernosum morphology. It was demonstrated that the corpus cavernosum is quite
76 affected with decreasing smooth muscles and increasing fibrosis in rats, probably
77 leading to erectile dysfunction(8). Recently, it was also reported that chronic stress
78 promotes different testicular changes when applied before and after puberty in rats(15).

79 However, no study assessed whether chronic stress cause the same effect on the penis
80 when applied before or after puberty. In addition, it is not known if the potential injuries
81 caused in the corpus cavernosum by the chronic stress are permanent or if it can recover
82 when the stressor stimulus is removed. Thus, this study aims to investigate the effects of
83 chronic stress on the corpus cavernosum of the rat penis at different ages (pre-pubertal
84 or adult), and whether such changes can be repaired after the end of the stressor
85 stimulus.

86

87

88 **Material and methods**

89

90 **Animals**

91 Seventy six male Wistar rats were used in the experiment. The animals were
92 kept in a room with a controlled temperature (mean \pm SD =22 \pm 1 °C) and artificial
93 dark-light cycles (lights on from 7:00 AM to 7:00 PM) and had free access to standard
94 rat food and water. All experiments were performed according to national and
95 international laws for the scientific use of animals. This project was also approved by
96 the local ethics committee.

97

98 **Experimental design**

99 Animals were randomly allocated into two groups: one of pre-pubertal rats (4
100 weeks of age) and another group of adult rats (10 weeks old), with a mean weight of
101 84.8 g and 283.4 g, respectively. Both groups of prepubertal and adult animals were
102 also divided according to the moment of euthanasia and evaluation, 24 hours after the
103 end of the last stress session (Immediate) or 6 weeks after the end of the last stress
104 session (lately). Four groups of age-matched animals were used as control for each
105 experimental group. Thus, the animals were divided into the following eight groups:
106 SP-I (pre-pubescent stressed rats, evaluated immediately, n = 10); SP-L (pre-pubescent
107 stressed rats, evaluated lately, n = 10); SA-I (adult stressed rats, evaluated immediately,
108 n = 9); SA-L (adult stressed rats, evaluated lately, n = 9); and control groups CP-I, CP-
109 L; CA-I and CA-L (one control group for each stressed group evaluated with the same
110 sample).

111 Animals from groups SP-I, SP-L, SA-I, and SA-L were submitted to chronic
112 stress, using the immobilization method(8, 15, 16). Each animal was kept inside a rigid

113 opaque plastic tube for two hours daily in the morning, in order to limit its movements.
114 It was done daily, every morning, during a period of 6 weeks. For this purpose, we used
115 plastic restraint tubes with different diameters and lengths according with the rats' size.
116 In contrast, the animals from control groups (CP-I, CP-L, CA-I, and CA-L) were not
117 subjected to any stresses, and were kept under normal conditions, but as well as
118 stressed groups, they were deprived of food and water for 2h per day. Animals from
119 groups SP-I, CP-I, SA-I, and CA-I were killed 24 hours after the last stress session,
120 when the rats were 10 (SP-I and CP-I) and 16 weeks old (SA-I and CA-I). Animals
121 from groups SP-L, CP-L, SA-L, and CA-L were kept under control conditions during 6
122 weeks after the end of the last stress session (the same period that they were submitted
123 to stress), when they were killed for late analysis. At this time, the rats were 16 (SP-L
124 and CP-L) and 22 weeks old (SA-L and CA-L).

125

126 **Testosterone analysis**

127 Immediately after the confirmed obit, blood was collected by cardiac puncture
128 and serum was stored at -20°C until analyzed. Serum testosterone levels were
129 determined using an ELISA commercial kit (Cat. ADI-900-065, Enzo, New York,
130 USA)(17).

131

132 **Morphometrical analysis**

133 The penises were collected and the skin-denuded middle part of the penile shaft
134 was fixed in 3.7% buffered formaldehyde solution and processed for paraffin
135 embedding. Non-serial cross-sections (of 5 µm thickness) were obtained and used for
136 histomorphometric evaluations. All morphometrical analysis was blinded performed.

137 The penis was sectioned at the base, and fixed by immersion in 3.7% buffered
138 formaldehyde solution for a maximum period of 48h, and processed for paraffin
139 embedding. Afterwards, cross sections of the middle third of the penis were then
140 performed to prepare histological slides of 5 μ m thickness, which were used for analysis.
141 These cross-sectional sections of the penis were stained by Masson's Trichrome to
142 evaluate the area of the penis, area of the corpus cavernosum (with and without tunica
143 albuginea) and the tunica albuginea area. The morphometrical analysis was performed
144 using the ImageJ program version 1.47t, and 5 slides per animal (blinded) were
145 analyzed. For each animal, area of the penis, area of the corpus cavernosum with and
146 without the tunica albuginea, and area of the tunica albuginea were assessed. All areas
147 were measured by using the "free hand" tool of the ImageJ software and the area of the
148 tunica albuginea was estimated by the difference in the areas of the corpus cavernosum.
149 For these analyzes, the images were captured at a 12x magnification in a stereo
150 microscope (Stereo Discovery.V8, Karl Zeiss, Jena, Germany) coupled to a digital
151 camera (Axiocam 506 color, Karl Zeiss, Germany)(18).

152 The density (Sv) of the structures of the corpus cavernosum, such as smooth
153 muscle, collagen and sinusoidal space, were evaluated in the same sections stained in
154 Masson's Trichrome, but captured at 200x magnification in a microscope (BX51,
155 Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera (DP70, Olympus)(19). Moreover,
156 other slides were stained by Weigert's resorcin-fuchsin and captured at 600x
157 magnification, in order to evaluate the elastic system fibers Sv. All these parameters
158 were evaluated by the point counting method, where a 100-point grid was superimposed
159 over the images using the tool "grid" of the ImageJ software(8, 20). Each structure
160 touched by a point was counted as smooth muscle, connective tissue, or sinusoidal
161 space, and the result was expressed as a percentage, considering the total area of the

162 image. For each animal, 25 images (5 fields of 5 sections) were evaluated, both from
163 sections stained by Weigert's resorcin-fuchsin and those stained by Masson's Trichrome.

164

165 **Statistical analysis**

166 All data were considered parametric according to the Kolmogorov-Smirnov
167 normality test. The mean values in each group of rats subjected to stress stimuli were
168 compared with those of the corresponding control group by using the Student *t*-test. All
169 analyses were performed with the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software,
170 San Diego, USA). Mean differences were considered significant when their *p* values
171 were <0.05. All results are presented as mean \pm standard deviation.

172

173

174 **Results**

175

176 **Pre-pubertal animals evaluated immediately**

177

178 Although the testosterone serum levels decreased in the SP-I group, there was no
179 statistical difference when compared to control group (11.93 ± 1.21 vs. 13.00 ± 1.67 , p
180 $= 0.23$).

181 No significant changes were found in the morphometrical analyses of the penis
182 of SP-I group when compared to the control group. The numeric data are listed in table
183 1. Concerning the density of penile structures, there was also no statistical difference
184 between the SP-I and the control group. The numerical data are shown in table 2.

185

186 Table 1. Morphometrical data of prepubertal or adult rats submitted to chronic stress and immediately evaluated (SP-I and SA-I) and its age
 187 matched control group (CP-I and CA-I)

	CP-I	SP-I	p value	CA-I	SA-I	p value
Corpus cavernosum with TA (mm ²)	5.09 ±0.53	5.26 ±0.67	0.53	5.89 ± 0.35	5.21 ± 0.71	0.02
Corpus cavernosum without TA (mm ²)	3.07 ±0.42	3.12± 0.41	0.80	3.63 ± 0.28	3.05 ± 0.58	0.02
Tunica albuginea (mm ²)	2.02 ±0.14	2.14± 0.41	0.38	2.26±0.12	2.15 ± 0.16	0.16

188

189 CP-I: pre-pubescent control rats, evaluated immediately. SP-I: pre-pubescent stressed rats, evaluated immediately. CA-I adult control rats,
 190 evaluated immediately. SA-I: adult stressed rats, evaluated immediately. TA: Tunica albuginea.

191 Data expressed as means ± SD

192

193 Table 2. Volumetric densities of prepubertal or adult rats submitted to chronic stress and immediately evaluated (SP-I and SA-I) and its age

194 matched control group (CP-I and CA-I)

195

	CP-I	SP-I	p value	CA-I	SA-I	p value
Smooth muscle V _v (%)	9.90 ± 1.95	10.6 ± 2.35	0.42	8.18 ± 1.98	4.70 ± 1.44	<0.01
Conjunctive tissue V _v (%)	73.7 ± 4.59	72.6 ± 3.57	0.56	74.5 ± 3.41	78.6 ± 3.57	0.03
Sinusoidal space (%)	16.3 ± 4.06	16.6 ± 3.12	0.85	17.3 ± 3.79	16.7 ± 2.93	0.76
Elastic fibers system (%)	0.79 ± 0.40	0.78 ± 0.21	0.96	2.38 ± 1.00	0.98 ± 0.24	<0.01

196 CP-I: pre-pubescent control rats, evaluated immediately. SP-I: pre-pubescent stressed rats, evaluated immediately. CA-I adult control rats,

197 evaluated immediately. SA-I: adult stressed rats, evaluated immediately. V_v: Volumetric density.

198 Data expressed as means ± SD

199

200

201

202

203 Adult animals evaluated immediately

204

205 There was a significant decrease of 21% of the testosterone serum levels of the
206 SA-I group when compared to the control group (8.83 ± 1.53 ng / ml vs. 11.25 ± 2.14
207 ng / ml, $p = 0.04$).

208 The SA-I group shown a significant reduction of 11.5% and 16% of the area of
209 the corpus cavernosum with tunica albuginea and of the corpus cavernosum area
210 without tunica albuginea, respectively, when compared to the control group. However,
211 no difference in the area of the tunica albuginea was observed. The numerical data are
212 listed in Table 1. Regarding the density of penile structures, there was a significant
213 decrease of 48% and 59% in the volumetric density of smooth muscle and elastic
214 system fibers of the SA-I group, respectively. On the other hand, the collagen
215 volumetric density increased 5.5% in the SA-I group compared to the control group. No
216 significant change was found in the volumetric density of the sinusoidal space in the
217 SA-I group compared to its control. The numerical data are shown in table 2.

218

219 Pre-pubertal animals evaluated lately

220

221 There was no difference in testosterone serum levels between the SP-L group
222 and control group (11.85 ± 1.91 ng / ml vs. 12.03 ± 2.59 ng / ml, $p = 0.89$).

223 No significant changes were found in the penile and the corpus cavernosum
224 areas of the SP-L group compared to the control group. The numerical data are shown in
225 table 3. However, there was a 48% reduction in the volumetric density of the elastic

226 system fibers in the SP-L group compared to the control group. All other parameters did
227 not present any significant changes between groups SP-L and CP-L. The numerical data
228 are listed in table 4.

229

230

231

232 Table 3. Morphometrical data of prepubertal or adult rats submitted to chronic stress and latently evaluated (SP-L and SA-L) and its age matched

233 control group (CP-L and CA-L)

	CP-L	SP-L	p value	CA-L	SA-L	p value
Corpus cavernosum with TA (mm ²)	5.34±0.28	5.52±0.37	0.24	6.45 ± 0.87	6.75 ± 0.44	0.38
Corpus cavernosum without TA (mm ²)	3.33 ±0.23	3.47 ±0.33	0.28	4.39 ± 0.59	4.39 ± 0.40	0.99
Túnica albugínea (mm ²)	2.00 ± 0.12	2.04 ±0.08	0.40	2.06 ± 0.28	2.35 ± 0.14	0.01

234 CP-L: pre-pubescent control rats, evaluated latently. SP-L: pre-pubescent stressed rats, evaluated latently. CA-L adult control rats, evaluated latently.

235 SA-L: adult stressed rats, evaluated latently. TA: Tunica albuginea.

236 Data expressed as means ± SD

237

239

240 Table 4. Volumetric densities of prepubertal or adult rats submitted to chronic stress and immediately evaluated (SP-L and SA-L) and its age

241 matched control group (CP-L and CA-L)

	CP-L	SP-L	p value	CA-L	SA-L	p value
Smooth muscle Vv (%)	8.13 ± 1.23	7.24 ± 1.00	0.11	7.89 ± 1.36	8.35 ± 0.88	0.40
Conjunctive tissue Vv (%)	73.0 ± 2.55	73.8 ± 2.77	0.55	72.4 ± 3.37	71.6 ± 4.79	0.70
Sinusoidal space (%)	18.8 ± 3.06	19.1 ± 2.87	0.81	19.6 ± 2.85	19.4 ± 4.44	0.92
Elastic fibers system (%)	1.98 ± 0.38	1.03 ± 0.49	<0.01	1.20 ± 0.50	1.18 ± 0.26	0.92

242 CP-L: pre-pubescent control rats, evaluated lately. SP-L: pre-pubescent stressed rats, evaluated lately. CA-L adult control rats, evaluated lately.

243 SA-L: adult stressed rats, evaluated lately. Vv: Volumetric density.

244 Data expressed as means ± SD

245

246 **Adult animals evaluated lately**

247

248 There was no significant difference of the testosterone serum levels between the
249 SA-L group compared to the control group (12.59 ± 2.17 ng / ml vs. 10.08 ± 2.43 ng /
250 ml, $p = 0.10$).

251 There was a significant increase of 14% of the area of the tunica albuginea of the
252 SA-L group compared to the control group. All other parameters did not present
253 significant changes between SA-L and CA-L groups. The numerical data are shown in
254 table 3. No difference was observed in the volumetric density of the penile structures of
255 the SA-L group when compared to the control group. The numerical data are listed in
256 table 4.

257 **Discussion**

258

259 Chronic stress is triggered by any event, psychological or physical, that persists
260 for a long time(21). It was already reported that chronic stress can be associated with
261 erectile dysfunction(13). However, erectile dysfunction may not result from stress, but
262 rather contribute to the emergence of stress, anxiety and even depression in man(1).
263 Despite these reports about the relationship between chronic stress and erectile
264 dysfunction, the deleterious effects of chronic stress on penile structures are unknown,
265 even about the main penile erectile tissue, the corpus cavernosum.

266 Some conditions associated with erection dysfunction, such as cardiovascular
267 diseases and smoking, are related to low concentrations of testosterone(22, 23).
268 Testosterone plays an important role in erectile function. This hormone has the potential
269 to modulate the penile architecture, as well as to promote alterations in the complex
270 neurovascular and biochemical mechanism(9). Successive repetitions of stress stimuli
271 can alter the hypothalamic-pituitary-adrenal (HHA) axis. In response, the
272 glucocorticoids circulation increase, which suppressing testosterone synthesis by the
273 Leydig cells(24). Therefore, the penile structures, which are androgen-dependent, can
274 suffer damage after chronic exposure to stressful stimuli(8). In the present study, we
275 observed that only adult animals evaluated immediately after the last stressor stimulus
276 presented a statistically significant reduction of testosterone. This suggests that adult
277 animals are more vulnerable to alterations in the HHA axis promoted by immobilization
278 stress, which was revealed on the analysis of the penile components, because this group
279 presented the most important changes.

280 Penile erection basically occurs by smooth muscle relaxation of the sinusoidal
281 space, arterial dilation and venous occlusion(7). Therefore, if any of these structures are

282 damaged, it can contribute to erection damage. In this study, the animals of the SA-I
283 group presented a significant decrease of the smooth muscle of the sinusoidal space, a
284 significant reduction of the elastic system fibers and a significant increase of the
285 collagen, which can compromise the organ complaisance. A study evaluating samples
286 from penile biopsy of men with erectile dysfunction shown a significant reduction of the
287 elastic system fibers in the corpus cavernosum(14), which reinforces the decrease of
288 complaisance. We also observed that in our animals, areas of the corpus cavernosum
289 with and without albuginea tunica reduced. Therefore, it clearly demonstrates the
290 importance of testosterone in maintaining the penile constituents in adults.

291 On the other hand, when adult animals are evaluated lately, 6 weeks after the last
292 stressor stimulus, we observed recovery of affected cavernous structures and in the
293 testosterone serum levels. Testosterone serum levels of the SA-L group were higher
294 than in the control group, even though the difference is not statistically significant, it
295 could mean a compensatory mechanism. Again, it reinforces the relationship between
296 testosterone and the integrity of the corpus cavernosum. Therefore, it seems that the
297 organ is able to recover after a long period without stress. The thickness of the tunica
298 albuginea was significantly higher in SA-L rats when compared to the control group.
299 Perhaps, this may be related to the increase, even though not significant, of testosterone
300 at the time of euthanasia. Miranda and colleagues (11) showed that the replacement of
301 testosterone in rats two months after orchiectomy restores the smooth muscle of the
302 corpus cavernosum. Although a functional penile evaluation has not been done in this
303 study, it suggests that withdrawal of the stressor stimulus in men suffering from stress-
304 induced erectile dysfunction could turn the sexual function to normal. Therefore, a
305 simple change in lifestyle may be part of the indicated treatment for men who suffer
306 from erectile dysfunction due to stress.

307 De Souza and colleagues (8) showed that rats submitted to chronic stress prior to
308 puberty to adulthood present lesser testosterone serum levels, reduced smooth muscle of
309 the corpus cavernosum and increased collagen, which did not corroborate our findings .
310 However, unlike the present study, they did not deprive the animals of the control group
311 of water and food for the same period rats received the stressor stimulus like us. Food
312 restriction can cause an increase in plasma levels of corticosterone in rats and may cause
313 a period of stress in these animals. Although this could happens, it is considered a low
314 intensity stressor(25). Based on this information, we can suggest that dietary restriction
315 in the present study may have influenced the difference of results between the two
316 studies. Another difference was the measurement of testosterone, performed by
317 radioimmunoassay in the article by Souza et al.(8), while in the present study the
318 analysis was done by ELISA. These factors may have contributed to the difference of
319 results between the two studies.

320 What really grabbed our attention were the changes observed in the SP-L group.
321 Elastic system fibers were reduced in those animals when compared to the control
322 group. This change may also compromise the penile complaisance, which can impair
323 erection. This is the first study showing that chronic stress applied before puberty can
324 injure a structure of the corpus cavernosum in adulthood, even after a long period
325 without stressor stimulus. This may explain or help to elucidate issues related to erectile
326 dysfunctions in adults who have suffered some kind of childhood stress. Thus, this
327 result shows the importance of avoiding exposure children to stress because the
328 consequences may manifest in the adulthood. However, there is no study on the long-
329 term effects on penises after undergoing chronic stress before puberty in men.

330 The present study used rats to evaluate the effects of chronic stress in the penile
331 corpus cavernosum, and it was a limitation because the results may not reflect what

332 occurs in men. However, rats are still considered good models for morphological
333 studies of the corpus cavernosum. Pinheiro and colleagues reported several
334 morphological differences on the corpus cavernosum between rat and man, and they
335 emphasized the importance of this knowledge to use rats as experimental models for
336 erectile dysfunction(26). However, comparing experimental studies in these animals
337 with clinical studies in men, the penile corpus cavernosum of the rat suffers similarly to
338 that of man in the presence of low testosterone concentrations(8, 27). For this reason, it
339 can be considered a good model. Although the present study did not evaluate the
340 erectile function of these animals, it was clear that chronic stress was harmful to the
341 corpus cavernosum of the rats, mainly if applied after puberty, and it can be associated
342 with erectile dysfunction. Moreover, in another study, rats stressed by immobilization
343 presented lesser intracavernous pressure and detumescence time, when the cavernous
344 nerve was stimulated, also demonstrating that erectile function can be compromised by
345 chronic stress(13).

346 Further studies on this issue are necessary, since the present study presented
347 some limitations. The study was performed in an animal model within controlled
348 experimental conditions, so the results of this study may not represent the events that
349 occur in stressed men. In addition, changes in the penile corpus cavernosum may vary
350 according to the type, intensity, and time of the stressor stimulus, as well as the age of
351 animals.

352 **Conclusion**

353

354 Chronic stress induces morphological changes in the penile corpus cavernosum
355 of rats. These changes were more important when the stress occurred in the adulthood,
356 and it may be related to erectile dysfunction.

357

358

359 **Acknowledgments**

360

361 This study was supported by grants from the National Council for Scientific and
362 Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Post-
363 Graduate Students (CAPES), and the Foundation for Research Support of Rio de
364 Janeiro (FAPERJ), Brazil.

365

366 **References**

367

- 368 1. Hehemann MC, Kashanian JA. Can lifestyle modification affect men's erectile
369 function? *Transl Androl Urol*. 2016 Apr;5(2):187-94.
- 370 2. Song SH, Kim DS, Shim SH, Lim JJ, Yang SC. Usage and perceptions of
371 phosphodiesterase type 5 inhibitors among the male partners of infertile couples. *Clin*
372 *Exp Reprod Med*. 2016 Mar;43(1):26-30.
- 373 3. Hedon F. Anxiety and erectile dysfunction: a global approach to ED enhances
374 results and quality of life. *Int J Impot Res*. 2003 Apr;15 Suppl 2:S16-9.
- 375 4. Sahin A, Urkmez A, Verit A, Yuksel OH, Verit FF. Psychologic and sexual
376 dysfunction in primary and secondary infertile male patients. *Arch Ital Urol Androl*.
377 2017 Jun 30;89(2):120-4.
- 378 5. Tal R, Voelzke BB, Land S, Motarjem P, Munarriz R, Goldstein I, et al.
379 Vasculogenic erectile dysfunction in teenagers: a 5-year multi-institutional experience.
380 *BJU Int*. 2009 Mar;103(5):646-50.
- 381 6. Teicher MH, Samson JA. Annual Research Review: Enduring neurobiological
382 effects of childhood abuse and neglect. *J Child Psychol Psychiatry*. 2016
383 Mar;57(3):241-66.
- 384 7. van Driel MF. Physiology of Penile Erection-A Brief History of the Scientific
385 Understanding up till the Eighties of the 20th Century. *Sex Med*. 2015 Dec;3(4):349-57.
- 386 8. de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic
387 stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl*. 2012 Jul-Aug;33(4):735-9.
- 388 9. Traish AM. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue
389 architecture and erection: a review. *J Androl*. 2009 Jul-Aug;30(4):363-9.

- 390 10. Blick C, Ritchie RW, Sullivan ME. Is Erectile Dysfunction an Example of
391 Abnormal Endothelial Function? *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14(2):163-7.
- 392 11. Miranda AF, Gallo CB, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of
393 castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. *J*
394 *Androl*. 2012 Nov-Dec;33(6):1224-32.
- 395 12. Wang XJ, Xu TY, Xia LL, Zhong S, Zhang XH, Zhu ZW, et al. Castration
396 impairs erectile organ structure and function by inhibiting autophagy and promoting
397 apoptosis of corpus cavernosum smooth muscle cells in rats. *Int Urol Nephrol*. 2015
398 Jul;47(7):1105-15.
- 399 13. Bal E, Murat N, Demir O, Soner BC, Can E, Gidener S, et al. Restraint stress
400 impairs erectile responses in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2009 Mar;217(3):239-42.
- 401 14. Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the
402 penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int*.
403 2006 Mar;97(3):567-9.
- 404 15. Ribeiro CT, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJB, Pereira-Sampaio MA.
405 Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats.
406 *Asian J Androl*. 2018 Jan 30.
- 407 16. Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, Barcellos Sampaio FJ,
408 Silva Costa W, Martins Cortez C. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar
409 male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res*.
410 2011;34(6):424-9.
- 411 17. Lu WP, Mei XT, Wang Y, Zheng YP, Xue YF, Xu DH. Zn(II)-curcumin
412 protects against oxidative stress, deleterious changes in sperm parameters and
413 histological alterations in a male mouse model of cyclophosphamide-induced
414 reproductive damage. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 Mar;39(2):515-24.

- 415 18. Felix-Patricio B, Medeiros JL, Jr., De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Penile
416 histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril
417 alone or in combination: a comparison with normotensive and untreated hypertensive
418 rats. *J Sex Med.* 2015 Jan;12(1):39-47.
- 419 19. Sena Ade S, Vargas RA, Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Morphometric
420 study of the corpus cavernosum after anabolic androgenic steroid administration in
421 pubertal and adult rats. *Acta Cir Bras.* 2015 Jul;30(7):478-83.
- 422 20. Felix-Patricio B, De Souza DB, Gregorio BM, Costa WS, Sampaio FJ. How to
423 Quantify Penile Corpus Cavernosum Structures with Histomorphometry: Comparison
424 of Two Methods. *Biomed Res Int.* 2015;2015:832156.
- 425 21. Shields GS, Slavich GM. Lifetime Stress Exposure and Health: A Review of
426 Contemporary Assessment Methods and Biological Mechanisms. *Soc Personal Psychol*
427 *Compass.* 2017 Aug;11(8).
- 428 22. Canat L, Canat M, Guner B, Gurbuz C, Caskurlu T. Association between renal
429 function, erectile function and coronary artery disease: detection with coronary
430 angiography. *Korean J Urol.* 2015 Jan;56(1):76-81.
- 431 23. Park MG, Ko KW, Oh MM, Bae JH, Kim JJ, Moon du G. Effects of smoking on
432 plasma testosterone level and erectile function in rats. *J Sex Med.* 2012 Feb;9(2):472-
433 81.
- 434 24. Stephens MA, Wand G. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in
435 alcohol dependence. *Alcohol Res.* 2012;34(4):468-83.
- 436 25. Spolidoro M, Baroncelli L, Putignano E, Maya-Vetencourt JF, Viegi A, Maffei
437 L. Food restriction enhances visual cortex plasticity in adulthood. *Nat Commun.*
438 2011;2:320.

- 439 26. Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE, Sampaio FJ. Organization and relative
440 content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of
441 rat penis. *J Urol.* 2000 Nov;164(5):1802-6.
- 442 27. Iacono F, Prezioso D, Ruffo A, Illiano E, Romis L, Di Lauro G, et al.
443 Testosterone deficiency causes penile fibrosis and organic erectile dysfunction in aging
444 men. Evaluating association among Age, TDS and ED. *BMC Surg.* 2012;12 Suppl
445 1:S24.
- 446
- 447
- 448

449 **Figure legends**

450

451 **Figure 1.**Corpus cavernosum adult rats immediately evaluated. A) Control adult rat. B)
452 Stressed adult rat. C) Control adult rat. D) Stressed adult rat. Images of the top row (A
453 and B) were stained with Masson's trichrome, 200x. Images of the bottom row (C,D, E
454 and F) were stained with Weigert'sresorcinfuchsin, 600x.

455

456 **Figure 2.**Corpus cavernosum of rats lately evaluated. A) Control adult rat. B) Stressed
457 adult rat. C) Control adult rat. D) Stressed adult rat. E) Control prepubertal rat. F)
458 Stressed prepubertal rat. Images of the top row (A and B) were stained with Masson's
459 trichrome, 200x. Images of the middle and bottom rows (C,D, E and F) were stained
460 with Weigert'sresorcinfuchsin, 600x.

Figure 1

[Click here to download Figure figure 1.tif](#)

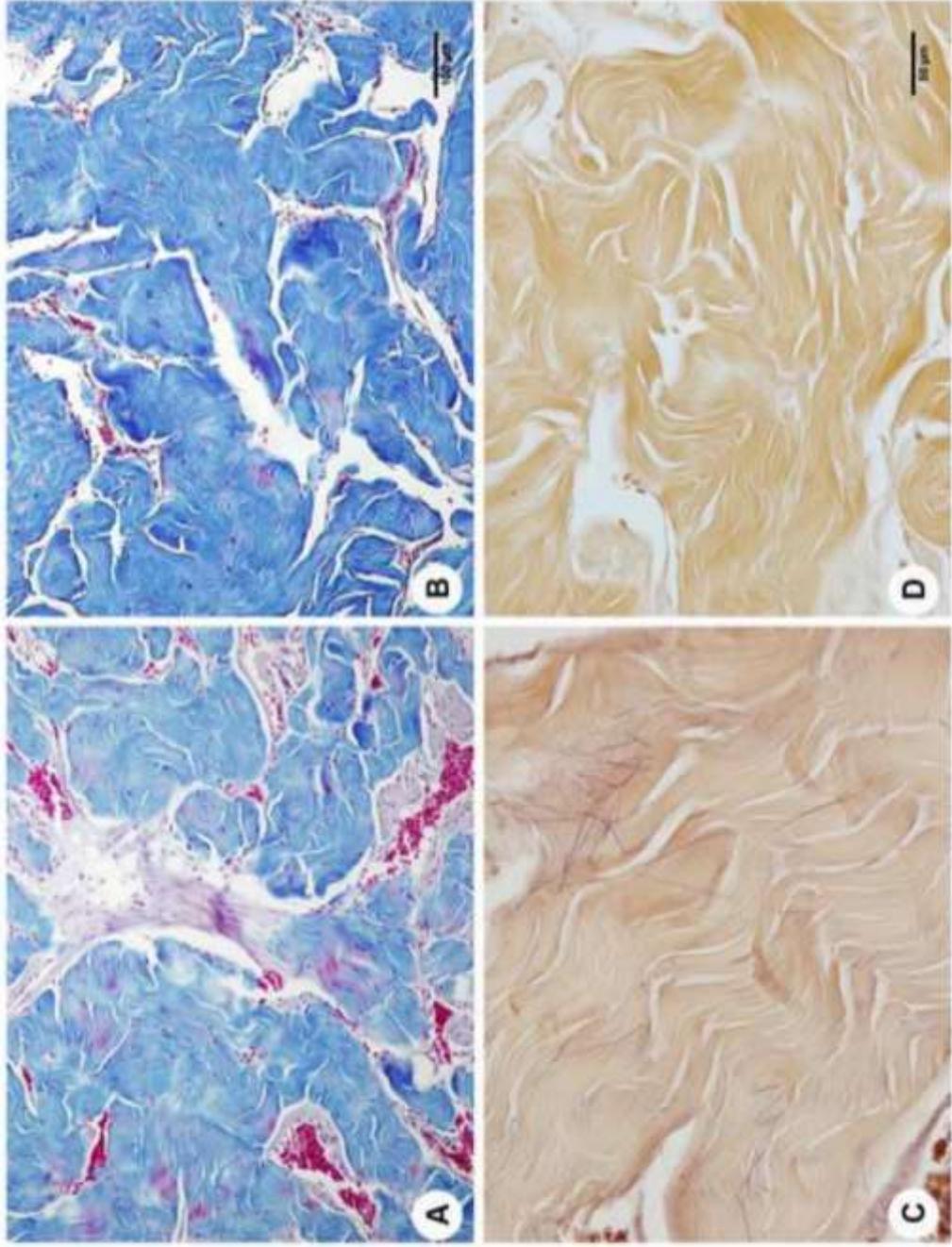
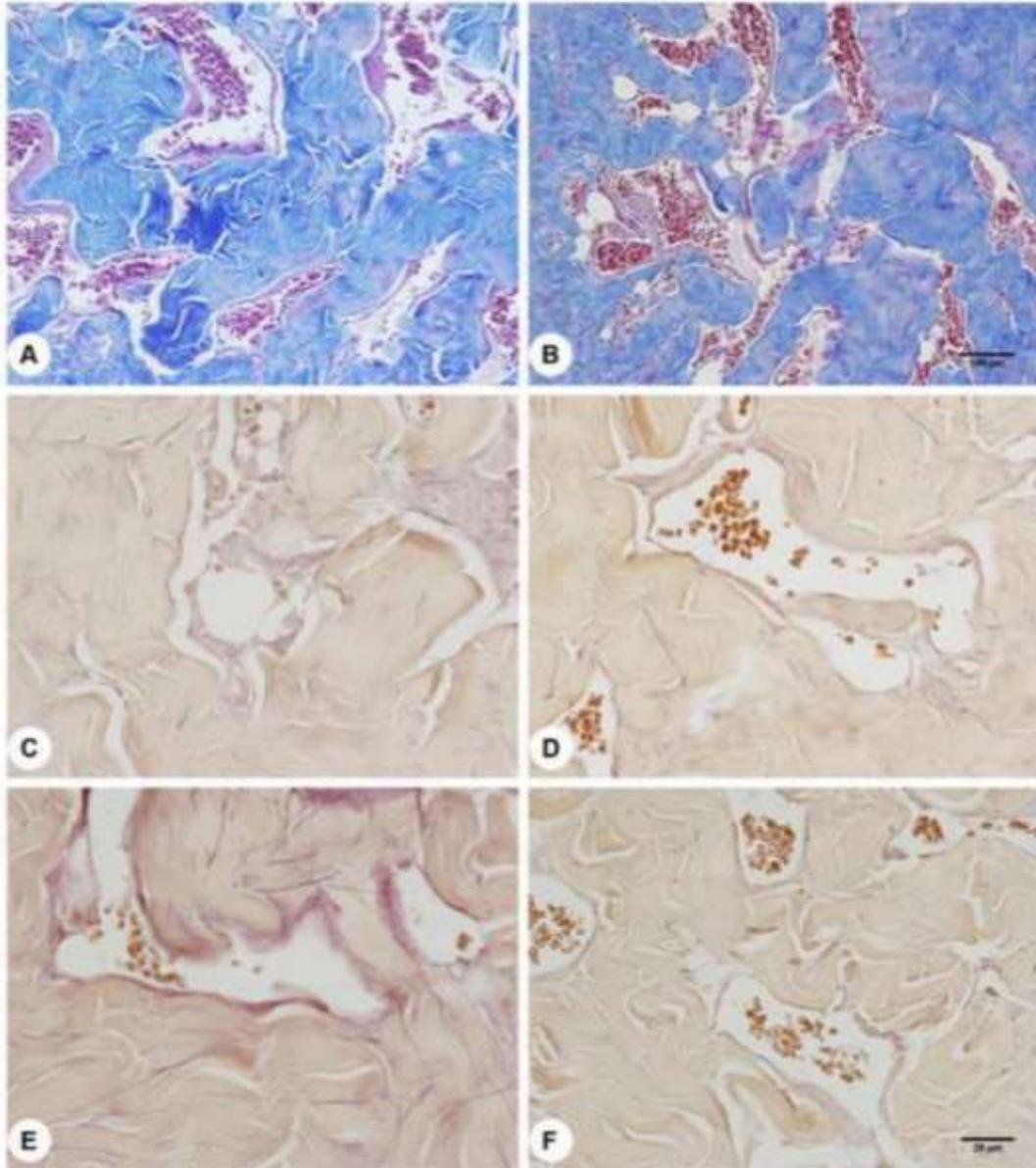


Figure 2

[Click here to download Figure figure 2.tif](#)

ANEXO – Autorização da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/004/2015 sobre "Avaliação dos efeitos agudos e tardios do estresse crônico em testículos de ratos pré-púberes e adultos" sob a responsabilidade de Diogo Benchimol de Souza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 27/01/2015. Este certificado expira em 27/01/2019.

Rio de Janeiro, 27 de Janeiro de 2015.

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ

f.ass