



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carla Braga Mano Gallo

**Efeitos da castração e da reposição hormonal com undecanoato de  
testosterona na bexiga urinária de ratos. Análise estrutural, ultra-estrutural  
e bioquímica**

Rio de Janeiro

2009

Carla Braga Mano Gallo

**Efeitos da castração e da reposição hormonal com undecanoato de testosterona na bexiga urinária de ratos. Análise estrutural, ultra-estrutural e bioquímica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Rio de Janeiro

2009

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

G172 Gallo, Carla Braga Mano.

Efeitos da castração e da reposição hormonal com undecanoato de testosterona na bexiga urinária de ratos: análise estrutural, ultra-estrutural e bioquímica / Carla Braga Mano Gallo.- 2009.

69 f. : il.

Orientador : Waldemar Silva Costa.

Coorientador : Francisco José Barcellos Sampaio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Testosterona - Uso terapêutico - Teses. 2. Terapia de reposição hormonal - Teses. 3. Bexiga - Histologia - Teses. 4. Androgenos - Teses. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Costa, Waldemar Silva. II. Sampaio, Francisco José Barcellos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.616.38:616.62

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

---

Assinatura

---

Data

Carla Braga Mano Gallo

**Efeitos da castração e da reposição hormonal com undecanoato de testosterona na  
bexiga urinária de ratos. Análise estrutural,  
Ultra-estrutural e bioquímica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-  
graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 04 de novembro de 2009.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

---

Prof. Dr. Francisco José Barcelos Sampaio  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane da Fonte Ramos  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

---

Prof. Dr. Marcio Antonio Babinski  
Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro

2009

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Alexandre de Freitas Miranda, pela orientação de toda parte experimental Do trabalho.

Ao Bruno Felix Patrício, pelo trabalho em equipe e colaborações técnicas histológicas.

À Profa. Dra. Cristiane da Fonte Ramos, pela orientação na parte de radioimunoensaio

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Macedo Cardoso, pela orientação na parte bioquímica.

## RESUMO

GALLO, Carla Braga Mano. *Efeitos da castração e da reposição hormonal com undecanoato de testosterona na bexiga urinária de ratos*. Análise estrutural, ultra-estrutural e bioquímica. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Evidências recentes em animais e humanos sugerem que níveis adequados de testosterona são necessários para as funções adequadas de diversos órgãos do sistema urogenital, incluindo a bexiga urinária. Estudos sobre os efeitos da testosterona na estrutura da parede da bexiga são raros. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar através de métodos qualitativos e quantitativos, as alterações estruturais da parede vesical de ratos submetidos à castração cirúrgica, bem como o papel da reposição hormonal na reversão das possíveis alterações estruturais. Foram usados 24 ratos machos Sprague-Dawley com aproximadamente 12 semanas de idade. Os animais foram divididos em 3 grupos compostos de 8 animais cada e tratados como a seguir. C = Grupo Castrado – os animais foram submetidos a orquiectomia e sacrificados após 2 meses, S = Grupo Simulado – os animais foram submetidos a operação simulada e sacrificados após 2 meses, T = Grupo Testosterona – os animais foram submetidos a castração e após 1 mês foram submetidos a reposição hormonal com undecanoato de testosterona em dose única subcutânea de 100 mg/kg (T) e após 1 mês da reposição hormonal foram sacrificados. Foram realizadas análises quantitativa e qualitativa do colágeno (usando histoquímica, histomorfometria, bioquímica e microscopia eletrônica de varredura), e análise histomorfométrica do músculo liso e das fibras do sistema elástico na parede da bexiga em controles e em ratos submetidos apenas a castração, e em ratos submetidos a castração e reposição hormonal. A análise morfométrica da altura do urotélio não apresentou diferença entre os grupos. Não houve diferença significativa na análise quantitativa do colágeno, tanto por histomorfometria quanto por bioquímica. Entretanto, a análise qualitativa mostrou diferenças do colágeno no grupo castrado quando comparado aos controles e aos ratos com reposição hormonal. Existiu uma diminuição significativa nos valores absolutos das fibras do sistema elástico no grupo castrado. Por outro lado, o músculo liso apresentou um aumento significativo na massa muscular por densidade de área nos ratos castrados; entretanto, a contagem dos núcleos das células musculares não apresentou variação entre os grupos, demonstrando que o aumento foi devido a hipertrofia muscular e não por aumento do número de células. Interessantemente, a reposição hormonal com testosterona foi capaz de reverter todas as alterações observadas. Os resultados sugerem que a reposição hormonal, mesmo quando instituída em fase tardia, é efetiva na reversão das alterações da parede da bexiga produzidas por hipogonadismo secundário.

**Palavras chaves:** bexiga, rato, testosterona, deficiência androgênica do envelhecimento masculino, reposição hormonal, histologia

## ABSTRACT

Recent evidences in animals and humans have suggested that adequate levels of testosterone are necessary to adequate functions of diverse organs of the urogenital system, including the urinary bladder. Studies on the effects of testosterone in the bladder wall structure are rare. Therefore, the objective of the present study is to evaluate, through qualitative and quantitative methods, the structural alterations in the bladder wall of rats submitted to surgical castration as well as the role of hormonal replacement in reversing the possible structural alterations. We used 24 male Sprague-Dawley rats that were approximately 12 weeks of age. The animals were divided into 3 groups composed of 8 animals each and treated as follows. Group C = group that underwent orchiectomy and were sacrificed after 2 months, Group S = sham group sacrificed after 2 months, and Group T = group that underwent orchiectomy, and after 1 month underwent testosterone replacement with a subcutaneous single dose of testosterone undecanoate at 100 mg/kg (T) and after 1 month of hormonal replacement, the animals were sacrificed. We performed a qualitative and quantitative analysis of collagen (by using histochemistry, histomorphometry, biochemistry, and scanning electron microscopy), and a histomorphometric analysis of smooth muscle and elastic system fibers in bladder wall of controls and rats submitted to orchiectomy alone and with hormonal replacement. The histomorphometric analysis on the epithelial height did not show differences among the groups. There was no statistically significant difference in the quantitative analysis for collagen, both by histomorphometry and biochemistry. Nevertheless, the qualitative analysis showed differences in collagen in the castrated group, when compared to controls and to rats with hormonal replacement. There was a significant decrease in the absolute values of elastic system fibers in the castrated group. On the other hand, the smooth muscle presented a significant increase in muscular mass by density of area in castrated rats; nevertheless, the counting of muscle cells nuclei did not present variation among the groups, demonstrating that this increase was due to cellular hypertrophy rather than by an increase in cells number. Interestingly, the hormonal replacement with testosterone was able to reverse all alterations observed. The results suggest that hormonal replacement, even when instituted at a late stage, is effective in reversing the bladder wall alterations produced by secondary hypogonadism.

**Keywords:** bladder, rat, testosterone, androgen deficiency of the aging male, hormonal replacement, histology

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cronograma de trabalho.....	6
Figura 2	Procedimento cirúrgico nos grupos simulado e castrado. No grupo castrado, procedia-se a ligadura do cordão espermático e retirada do testículo. No grupo simulado, após a etapa indicada em C, o testículo era re-posicionado no escroto.....	7
Figura 3	Bexiga de rato.....	9
Figura 4	Esquema das divisões feitas na bexiga.....	9
Figura 5 A	Utilização do software Image J para visualização da fotomicrografia e aferição da altura do epitélio.....	13
Figura 5 B	Figura 5 – B) Calibração para 2040 x 1536 (600x). Ajustes feitos com a ferramenta “Analyse / Set Scale”.....	13
Figura 5 C	Marcação da altura do epitélio para aferição.....	14
Figura 5 D	Ferramenta “Measure” para obtenção do valor da altura do epitélio.....	14
Figura 6 A	Calibração para 2040 x 1536 (400x).....	16
Figura 6 B	Imagem que será analisada e marcação da lâmina própria.....	16
Figura 6 C	Inversão da seleção para eliminar o que não fará parte da análise.....	17
Figura 6 D	Imagem somente com o que será analisado. Novamente, inversão para mensurar a área selecionada (lâmina própria).....	17
Figura 6 E	Lâmina própria foi mensurada. Utilização do “Plugin grid” para inserir a grade.....	18
Figura 6 F	Para avaliar o percentual de tecido elástico na lâmina própria, uma grade com cruces, foi colocada sobre o corte histológico, sendo que 100 cruces ficavam sobre a área de lamina própria previamente estipulada. ....	18
Figura 6 G	Com a utilização do “plugin cell counter” foram marcadas as fibras que passavam no quadrante superior direito de cada cruz da grade. A partir do número de pontos selecionados, foi calculada a porcentagem de fibras do sistema elástico da área quantificada.....	19
Figura 7 A	Utilização do software Adobe Photoshop para visualização da fotomicrografia da parede da bexiga no campo previamente capturado.	21

Figura 7 B	Seleção do fundo com escurecimento do mesmo e retirada do urotélio, para obtenção de um campo específico apenas com a parede da bexiga, a ser utilizado pelo software Image-Pro Plus.....	22
Figura 7 C	Com a fotomicrografia da parede da bexiga sem o urotélio e com o fundo em preto, a imagem foi salva e aberta no software Image-Pro, para ser feita a avaliação da porcentagem que a parede da bexiga ocupava na fotomicrografia. A área marcada em preto foi transformada em verde, sendo utilizado a ferramenta “performance seguimentation”, com a finalidade de definir a área da bexiga.....	22
Figura 7 D	Com a marcação feita em verde, foi criada uma máscara através do botão New Mask, visando a quantificação da área de bexiga.....	23
Figura 7 E	Em branco a máscara e em preto a parte correspondente à parede da bexiga.....	23
Figura 7 F	Com a ferramenta “Histogram” foi realizada a mensuração da área. Inicialmente o histograma aparece com as marcações (em verde) significando as áreas limites para as cores preto (lado esquerdo) e branco (lado direito).....	24
Figura 7 G	O afastamento das linhas do “Histogram” para o limite máximo externo indica a área total correspondente ao campo todo da imagem, identificado na figura como 100%. Assim, foi avaliada a área em porcentagem, que a bexiga ocupa na área total da imagem.....	24
Figura 8 A	Mesma imagem utilizada anteriormente na quantificação da parede da bexiga. Em verde, foi feita a marcação das áreas de cor vermelha na imagem original, que correspondiam ao colágeno.....	26
Figura 8 B	Assim, foi criada uma máscara para calcular a área que o colágeno ocupava na bexiga, onde a cor branca era de interesse (colágeno).....	27
Figura 8 C	Utilização do histograma para quantificação, com a marcação do colágeno em branco.....	27
Figura 9 A	Calibração utilizando a barra de escala de 2040 x 1536 (400x).....	28
Figura 9 B	Utilização do software Image J para visualização da fotomicrografia e contagem dos núcleos.....	29
Figura 9 C	Marcação da área para contagem.....	29
Figura 9 D	Utilização da ferramenta “Clear outside” para remover a área que não será utilizada para contagem.....	30
Figura 9 E	Mensuração da área.....	30
Figura 9 F	Ferramenta “Cell Counter” utilizada para contagem.....	31

Figura 9 G	Contagem de núcleos.....	31
Figura 10	Aparelho de ponto crítico utilizado para desidratação sob pressão (Critical Point Dryer - Pelco CPD2).....	34
Figura 11	Processo de metalização. A) - Aparelho metalizador Cressington Stutier Coater 108. B) - Amostra metalizada, pronta para observação no microscópio de varredura.....	34
Figura 12	Observação da amostra em microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss Leo 435.....	35
Figura 13	Resultados para dosagem sérica de testosterona em ng/mL para os grupos castrado, simulado (sham) e castrado com reposição de testosterona. ANOVA com pós teste de Newman Keuls, $p < 0,01$ .....	36
Figura 14	Resultados para medida da altura do epitélio da bexiga em $\mu\text{m}$ para os grupos Castrado (C), Simulado (S) e Castrado com reposição de testosterona (T). ANOVA; ( $p = 0,8369$ ).....	37
Figura 15	Análise qualitativa do colágeno na lâmina própria. A) Grupo castrado (C). B) Grupo simulado (S). C) Grupo castrado com reposição de testosterona (T). Verifica-se que o grupo C apresentou predominância de fibras de cor verde e os grupos S e T apresentaram predominância de fibras de cor vermelha. Vermelho de Picrosirius sob luz polarizada, X400.....	39
Figura 16	Análise qualitativa do colágeno no músculo da bexiga (detrusor). A) Grupo castrado (C). B) Grupo simulado (S). C) Grupo castrado com reposição de testosterona (T). Verifica-se que o grupo C apresentou predominância de fibras de cor verde e os grupos S e T apresentaram predominância de fibras de cor vermelha. Vermelho de Picrosirius sob luz polarizada, X400.....	40
Figura 17	Resultado da quantificação do colágeno na parede da bexiga. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA, $p = 0,1412$ .....	41
Figura 18	Resultado da quantificação bioquímica do colágeno total na parede da bexiga. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA, $p > 0,05$ .....	42
Figura 19	Resultado da quantificação das fibras do sistema elástico na parede da bexiga. ANOVA com pós teste de Bonferroni's, $p = 0,002$ .....	43
Figura 20	Resultado da quantificação do músculo liso. O grupo castrado apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo simulado ( $p < 0,05$ ). O grupo simulado quando comparado ao grupo castrado com reposição de testosterona não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). (ANOVA com pós teste de Teste de Tukey) .....	44

Figura 21	Resultado da densidade de células musculares lisas por área no músculo da bexiga. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA, $p = 0,3035$ .....	45
Figura 22	Forma e arranjo das fibras colágenas observadas em microscopia eletrônica de varredura. Fibras colágenas em forma de corda emaranhadas na bexiga de ratos. Fibrilas colágenas muito finas formando uma rede. Zeiss Leo 435, X5000.....	47
Figura 23	Forma e arranjo das fibras colágenas observadas em microscopia eletrônica de varredura. A) Grupo castrado. B) Grupo simulado. C) Grupo castrado com reposição de testosterona. Fibras colágenas em forma de corda emaranhadas na bexiga de ratos. Fibrilas colágenas muito finas formando uma rede. Zeiss Leo 435, X2000.....	48

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>C</b>	–	Grupo castrado
<b>DAEM</b>	–	Deficiência Androgênica do Envelhecimento Masculino
<b>DE</b>	–	Disfunção erétil
<b>IPSS</b>	–	Escore Internacional de Sintomas Prostáticos
<b>S</b>	–	Grupo controle
<b>STUI</b>	–	Sintomas do Trato Urinário Inferior
<b>T</b>	–	Grupo orquiectomizado que recebeu, após 1 mês, suplementação com undecanoato de testosterona. Após 1 mês de reposição hormonal os animais foram mortos.



<b>2 RESULTADOS</b>	36
2.1 Testosterona sérica	36
2.2 <b>Análise morfométrica, morfológica e bioquímica da parede da bexiga</b>	37
2.2.1 <u>Quantificação da altura do epitélio</u>	37
2.2.2 <u>Análise qualitativa do colágeno</u>	38
2.3 <b>Quantificação do colágeno</b>	41
2.4 <b>Quantificação bioquímica do colágeno total</b>	42
2.5 <b>Quantificação das fibras do sistema elástico</b>	43
2.6 <b>Quantificação do músculo liso</b>	44
2.7 <b>Contagem de Núcleos no músculo detrusor</b>	45
2.8 <b>Microscopia eletrônica de varredura</b>	46
2.8.1 <u>Caracterização das fibras colágenas</u>	46
<b>3 DISCUSSÃO</b>	49
<b>4 CONCLUSÕES</b>	53
<b>REFERÊNCIAS</b>	54
<b>ANEXO</b>	59

O presente trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Recebeu apoio financeiro, direta ou indiretamente, de CNPq, FAPERJ e CAPES.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Não há conflito de interesses.

## INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo rapidamente, assim como a expectativa de vida, e ao mesmo tempo observa-se uma redução na taxa de fertilidade. Estas mudanças em conjunto, culminam com o envelhecimento da população mundial.

A busca por boa qualidade de vida, não somente para viver cada vez mais, mas sim para viver cada vez melhor, proporcionou um avanço na medicina, na busca por prevenção das doenças, com modernos tratamentos clínicos e cirúrgicos.

A habilidade para manter um estilo de vida ativa e independente, tão longo quanto possível, é um fator crucial na dignidade humana com o envelhecimento [1].

O campo das alterações hormonais no envelhecimento masculino se encontra em expansão, com aumento de interesse na comunidade médica e por parte do público leigo. Simultaneamente, a indústria tomou consciência da sua importância e enorme potencial numa população de homens mais idosos, que passam dos 50 anos. Uma parcela significativa (13,3%) da população masculina brasileira acima dos 40 anos tem sintomatologia sugestiva de Deficiência Androgênica do Envelhecimento Masculino (DAEM). Falha erétil, falta de desejo e/ou desempenho sexual insatisfatório, irritabilidade, alterações do sono, dores nas articulações e músculos e estado depressivo, entre outros, compõem essa sintomatologia [2]. Deve-se investigar DAEM em homens acima de 40 anos com falha de ereção e sem resposta aos inibidores de fosfodiesterase tipo 5 (PDE5). Também, deve-se investigar DAEM em homens acima de 40 anos com sintomatologia depressiva e que não respondem ao tratamento antidepressivo [2].

Nos Estados Unidos da América estima-se que existam aproximadamente 2.4 milhões de pessoas com DAEM. A manifestação clínica do hipogonadismo secundário masculino tem sido bem definida acima dos 50 anos, mas a terapia de reposição hormonal não foi ainda amplamente aceita, em parte devido às expectativas não satisfeitas, aos efeitos colaterais e aos possíveis riscos. Embora alguns trabalhos apontem para os riscos de reposição hormonal, especialmente com relação ao câncer de próstata [3], trabalhos recentes têm demonstrado ser bastante segura a terapia de reposição hormonal masculina [4-6]. É sabido que pacientes com testosterona baixa e câncer de próstata têm pior prognóstico [7], bem como tem sido demonstrado que a incidência de câncer de próstata aumenta à medida que diminuem os níveis séricos de

testosterona [8]. Assim, diversas evidências recentes demonstram que a testosterona não induz câncer de próstata.

Com o envelhecimento ocorre redução progressiva na concentração sérica dos hormônios sexuais masculinos, que apresentam queda de 1% ao ano após os 50 anos, sendo que nas faixas etárias mais avançadas a testosterona está reduzida entre 15 e 20% dos indivíduos [9].

Na última década foram publicados numerosos trabalhos sobre as vantagens e desvantagens do uso (reposição) de testosterona em indivíduos idosos [10]. O interesse demonstrado se deve à preocupação na melhora da qualidade de vida de indivíduos do sexo masculino. Estudos já demonstraram que a testosterona intensifica o interesse sexual e a suplementação de testosterona para castrados pode restaurar a função erétil [11,12].

A deficiência de testosterona causa uma menor lipólise, menor taxa metabólica, deposição de gordura visceral e resistência à insulina. A obesidade central é considerada o fator de risco número um para a saúde do homem e a associação inversa entre a testosterona e a obesidade central está bem documentada. A obesidade central é também um fator de risco importante para disfunção erétil (DE), e a redução da obesidade central pode melhorar a função erétil. O tecido adiposo abdominal coloca os homens em um círculo vicioso que pode ser quebrado restaurando-se a testosterona para sua variação normal ou “natural” [13-15].

A investigação de resistência à insulina (controle glicêmico) é de importância central para o diagnóstico e tratamento da diabetes tipo 2. Foi verificado que até 50% dos pacientes com diabetes são hipogonadais e que a restauração da testosterona para a variação normal (“natural”) melhora o controle glicêmico. Os pacientes diabéticos com DE podem ser candidatos muito interessantes para o tratamento de combinação com inibidores da PDE5 e testosterona exógena. Também, os triglicérides elevados e a lipoproteína de alta densidade (HDL) baixo foram identificados como fatores de risco para a saúde masculina. A associação deles com a testosterona baixa e a DE foi demonstrada em estudos epidemiológicos e de intervenção. A testosterona IM e o gel de testosterona melhoram o padrão lipídico [15-19].

Também, a hipertensão é bem conhecida como um fator de risco para a saúde cardiovascular e está relacionada à deficiência de testosterona. Muitos estudos demonstraram o alto predomínio de disfunção erétil nos homens com pressão arterial

alta. Existem evidências recentes de que a testosterona reduz significativamente a hipertensão [20-22].

A terapia de reposição androgênica em homens hipogonádicos está bem documentada, especialmente porque a restauração das concentrações de testosterona nos limites normais mantém as características sexuais, a energia, o humor, o desenvolvimento de massa muscular e o aumento de massa óssea [10].

A ação da testosterona na próstata e no pênis recebeu maior atenção quando comparados aos demais órgãos do sistema urogenital. Trabalhos que enfocam outros órgãos do sistema urogenital são raros. Menos numerosos ainda são aqueles que tratam das alterações na bexiga [23]. Além disso, os trabalhos existentes mostram a ação da testosterona quando a reposição hormonal é feita em tempo relativamente curto após a constatação do déficit hormonal. Pouco se sabe dos efeitos da reposição hormonal tardia. Rekers et al. (1992) [24] mostraram que o hipoestrogenismo diminui o tecido conjuntivo de sustentação da bexiga e da uretra. Há perda de elasticidade e atrofia da mucosa uretral e do colo vesical, assim como comprometimento do aporte sanguíneo e do colágeno, e redução da resposta muscular da uretra ao estímulo adrenérgico. Tais eventos contribuem para diminuir a pressão intra-uretral e a taxa de transmissão da pressão abdominal à uretra proximal, elementos fundamentais na continência urinária.

Cayan et al. (2008) [23] fizeram um estudo experimental, utilizando urodinâmica e análise histológica, em ratas castradas submetidas à reposição hormonal com testosterona isoladamente e com testosterona e estradiol. O estudo mostrou que a função vesical pode deteriorar-se na pós-menopausa. Além da reposição hormonal com estrogênio, a testosterona teve um importante papel para aumentar o músculo liso da bexiga. Isto pode levar a uma melhora da função vesical nas mulheres menopausadas com disfunção do sistema urogenital.

Com o envelhecimento a diminuição de testosterona contribui para a frequência urinária, causando desconforto em homens idosos [25].

Koristsiadis et al. (2008) [26] demonstraram em humanos que baixos níveis de testosterona em pacientes com obstrução ao fluxo vesical correlacionaram negativamente com a pressão ao final da micção e com a pressão do detrusor ao fluxo máximo, assim como promoveram hiperatividade do detrusor. Concluíram que os androgênios parecem ter um papel de melhorar a função do trato urinário inferior.

Foi demonstrado em estudos com humanos que além de melhorar a função sexual, a terapia de reposição com testosterona pode também melhorar os sintomas do

trato urinário inferior e função vesical. Esta melhora é através do aumento da complacência e da capacidade da bexiga e diminuição da pressão do detrusor ao fluxo máximo em homens com hipogonadismo sintomático de aparecimento tardio [27,28].

Atualmente, existem fortes evidências de que a obesidade central em adultos, a síndrome metabólica, a disfunção erétil e os sintomas do trato urinário inferior (STUI) estão associados com níveis de testosterona abaixo do normal, embora a relação entre testosterona e STUI ainda não esteja bem estabelecida. Foram estudados 95 homens hipogonádicos de meia idade e idosos, tratados com undecanoato de testosterona intramuscular. Com respeito ao trato urinário foram avaliados o Escore Internacional de Sintomas Prostáticos (IPSS), o volume prostático e o antígeno prostático específico. Houve melhora no IPSS, embora o mecanismo de ação da testosterona ainda não esteja claro [29].

Assim, nesta visão holística da saúde masculina e na investigação do sistema urogenital, temos analisado o papel e a importância da testosterona em diversos órgãos deste sistema. Miranda (2009) [30] realizou recentemente em nosso laboratório, um trabalho original analisando os efeitos da castração cirúrgica, com e sem reposição hormonal, nas estruturas do corpo cavernoso de ratos machos. No presente trabalho, seguindo o mesmo protocolo de pesquisa, o foco da investigação é a bexiga urinária.

O objetivo do presente trabalho é através de métodos quantitativos e qualitativos caracterizar as possíveis alterações estruturais na parede da bexiga de ratos submetidos à castração cirúrgica, bem como o papel da reposição hormonal com testosterona para reverter possíveis alterações observadas.

## **1 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1.1 Comitê de ética**

O projeto e o protocolo de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Anexo-1.

### **1.2 Descrição da amostra**

Foram utilizados 24 ratos Sprague-Dawley machos, mantidos em biotério sob condições padrão, com idade de 12 semanas, divididos em 3 grupos de 8 animais cada:

- Grupo-C - Castrado
- Grupo-S - Simulado
- Grupo-T - Castrado com reposição de Testosterona

### **1.3 Cronograma de trabalho**

Dia - 1 - Foi realizado o procedimento cirúrgico nos 24 ratos:

- Grupo-C - Castração dos ratos
- Grupo-S - Simulação da cirurgia de castração
- Grupo-T - Castração dos ratos

Dia - 30 - Reposição hormonal com testosterona no grupo T.

Dia - 60 - Sacrifício de todos os animais.

<b>N</b>	<b>Grupos</b> (Ratos machos Sprague-Dawley)	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 30</b>		<b>Dia 60</b>
8	C - CASTRADO	<b>CIRURGIA</b>				<b>SACRIFÍCIO</b>
8	S - SIMULADO					
8	C - CASTRADO + TESTOSTERONA					

Testosterona

Figura 1 - Cronograma de trabalho.

#### 1.4 Procedimento cirúrgico

Todo procedimento cirúrgico foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas - UERJ.

No dia-1, todos os grupos foram submetidos à cirurgia com anestesia intraperitoneal de 60 a 80mg de cetamina + 8 a 15mg de xilazina, por quilo de peso corporal. Foi realizada a abertura do escroto na linha média com incisão de 2 cm e dissecação até a exposição dos testículos. (Figura -2)

Os grupos-C e T tiveram os testículos retirados após prévia ligadura do cordão espermático com fio de algodão 3-0.

No grupo-S, os testículos foram expostos, manipulados e reinsertados no escroto.

Todos os grupos tiveram a bolsa escrotal fechada com pontos simples de fios de nylon 4-0.

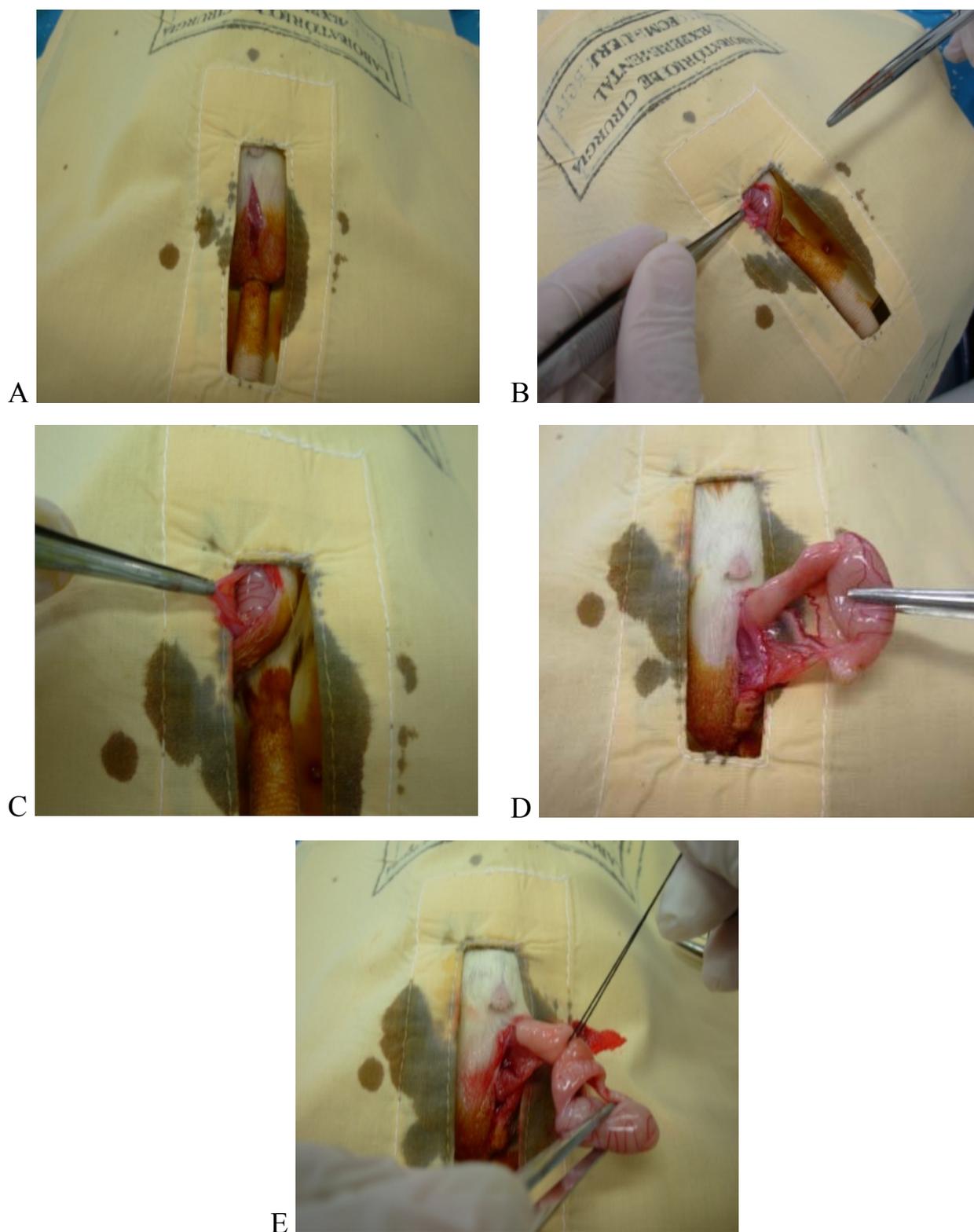


Figura 2 – Procedimento cirúrgico nos grupos simulado e castrado. No grupo castrado, procedia-se a ligadura do cordão espermático e retirada do testículo. No grupo simulado, após a etapa indicada em C, o testículo era re-posicionado no escroto.

### **1.5 Suplementação com testosterona**

No dia-30 foi feita a suplementação hormonal no grupo-T, com undecanoato de testosterona em dose única, subcutânea, de 100mg/kg [31].

### **1.6 Sacrifício dos animais e obtenção do material biológico**

Após 60 dias todos os animais foram sacrificados. Os animais foram sedados com éter sulfúrico e mortos por deslocamento cervical.

#### **1.6.1 Coleta de sangue**

O sangue foi retirado por punção intracardíaca (do ventrículo direito) e imediatamente acondicionado em gelo e posteriormente centrifugado a 4°C em 3000 rpm por 30 min. O plasma foi separado e estocado a -80°C. A partir do plasma foi realizada a dosagem das concentrações séricas de testosterona.

#### **1.6.2 Coleta da bexiga**

As bexigas dos ratos foram dissecadas e retiradas, sendo divididas em segmentos e imediatamente colocadas em diferentes fixadores para serem analisadas por histoquímica, bioquímica, e microscopia eletrônica de varredura (Figura-3 e 4).

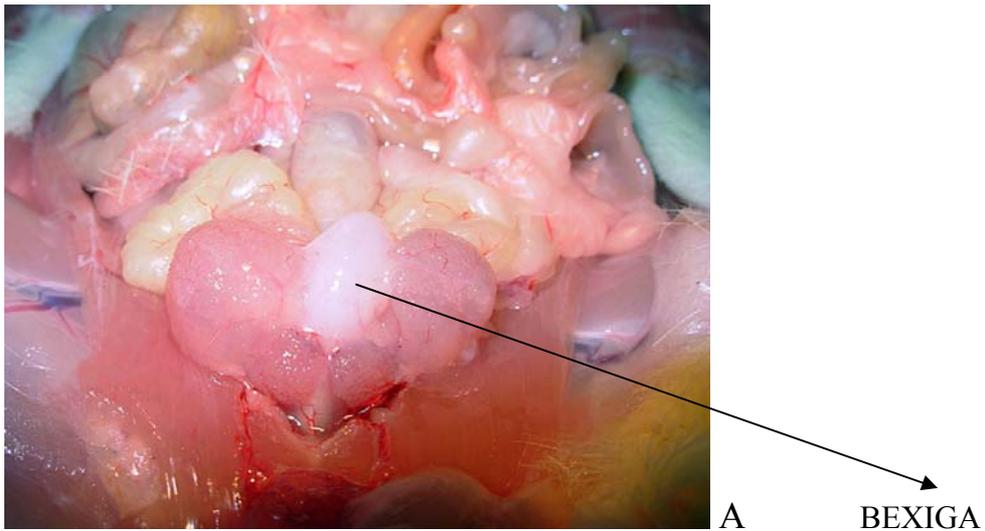


Figura 3 – Bexiga de rato.

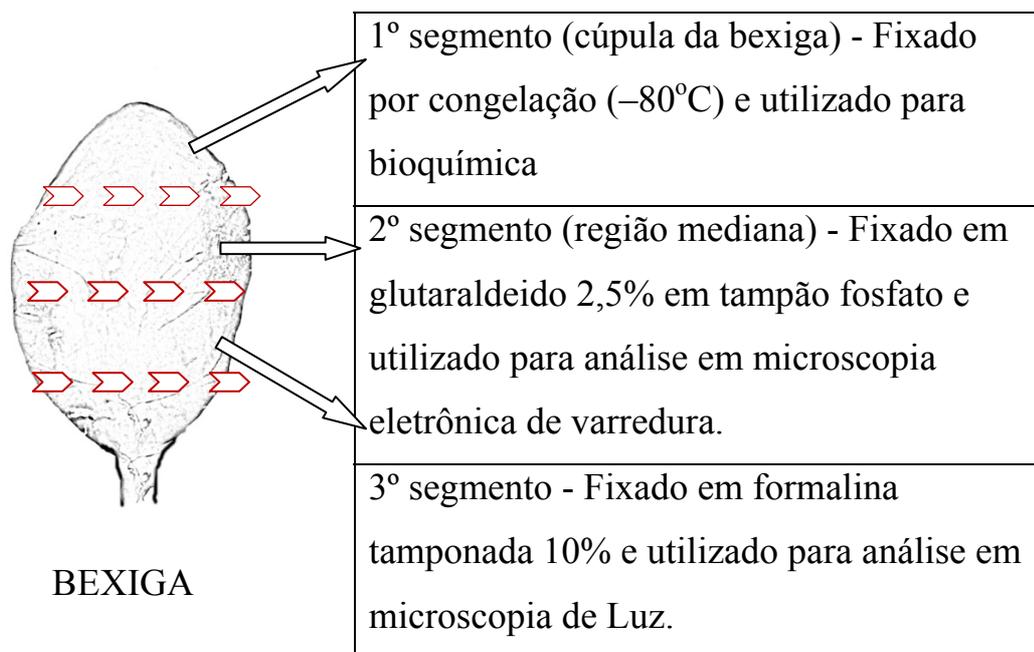


Figura 4 – Esquema das divisões feitas na bexiga.

## 1.7 Técnicas utilizadas para análise das amostras

### 1.7.1 Dosagem de testosterona sérica

A dosagem da concentração de testosterona foi realizada em todos os grupos a partir do plasma no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Unidade de Pesquisa Urogenital – UERJ. As concentrações séricas de testosterona foram determinadas usando radioimunoensaio (RIA) específico para o hormônio (RIC Pharmaceuticals, Inc, CA, EUA). O coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi 4,6 e 7,5% para testosterona. Sensibilidade do RIA foi 0,04 ng/mL para testosterona [32].

Foi feita análise de variância univariada ANOVA, seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. Os dados foram analisados no software Graphpad Prism 5.00.

### 1.7.2 Microscopia de luz

No Laboratório de Estrutura e Ultraestrutura da Unidade de Pesquisa Urogenital – UERJ foi realizado todo procedimento de preparo do material e obtenção de resultados referentes à microscopia de luz.

O material utilizado para a microscopia de luz foi fixado em formalina tamponada 10% e processado para inclusão em paraplast. Os cortes histológicos foram feitos com 3 $\mu$ m de espessura e corados por diferentes técnicas histológicas.

### 1.7.3 Histoquímica

Hematoxilina & Eosina - Os cortes corados por hematoxilina & eosina foram utilizados para verificar a integridade do tecido e quantificação dos núcleos do músculo vesical (detrusor) por unidade de área (observados com objetiva de 40x).

Resorcina-Fucsina de Weigert - Os cortes corados pela técnica Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação pela oxona foram utilizados na quantificação das fibras do sistema elástico.

Vermelho de Picrosirius - Os cortes corados com a técnica de Vermelho de Picrosirius (observados com e sem luz polarizada) foram utilizados para as seguintes observações:

- Análise qualitativa dos diferentes tipos de colágeno (sob luz polarizada, observadas com objetiva de 40x).
- Análise morfométrica da altura do epitélio (sem luz polarizada, com imagem capturada através de objetiva de 60x).
- Análise quantitativa da parede da bexiga, colágeno e fibras musculares lisas (sem luz polarizada, com imagem capturada através de objetiva de 10x)

#### 1.7.4 Métodos quantitativos em microscopia de luz

##### 1.7.4.1 Captura e Análise das Imagens

Todos os cortes dos tecidos foram fotografados sob as mesmas condições e com uma resolução de 2040 x 1536 pixels, com uma câmera digital (Olympus DP70, Tokyo, Japan) diretamente acoplada a um microscópio (Olympus BX51, Tokyo, Japan) e armazenada no formato de arquivo TIFF.

##### 1.7.4.2 Morfometria do Epitélio

Foram obtidos 2 cortes histológicos da bexiga de cada animal (8 animais por grupo), sendo analisados 5 campos em cada corte e aferidas 10 medidas em cada campo. Assim, foram analisados 10 campos e aferidas 100 medidas em cada animal, totalizando 80 campos e 800 aferições em cada grupo.

O software Image J versão 1.4 (NIH, Bethesda, USA), carregado com seu próprio “plugin” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>) foi usado para aferição da altura do epitélio (Figura – 5).

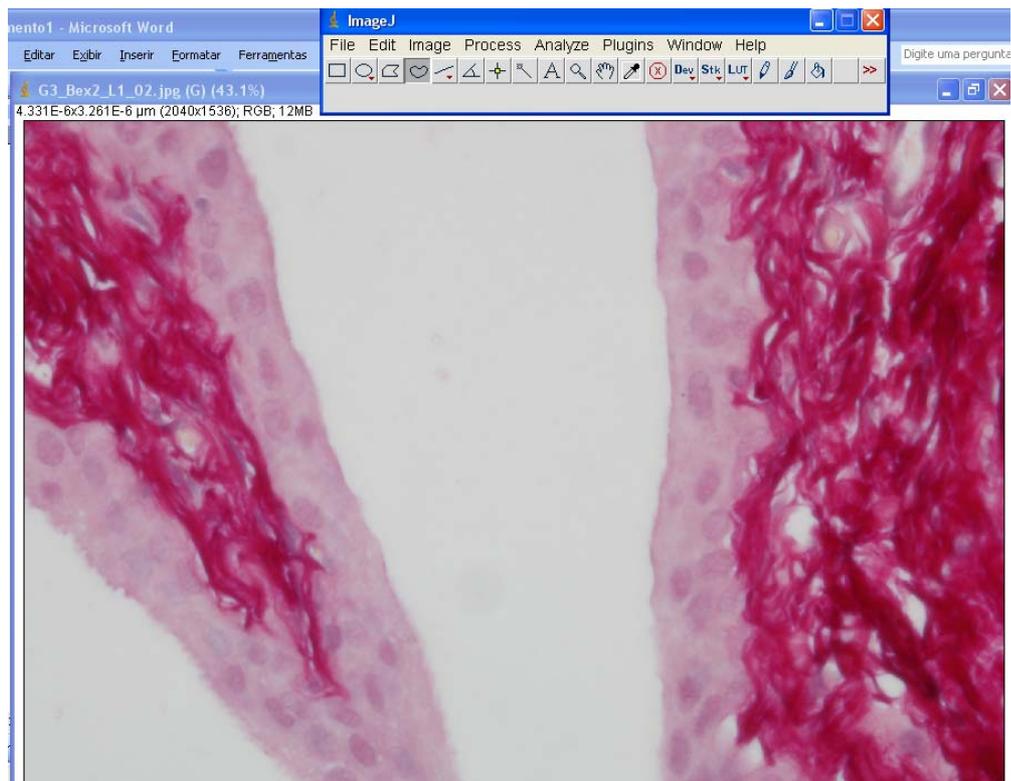


Figura 5 - A) Utilização do software Image J para visualização da fotomicrografia e aferição da altura do epitélio.

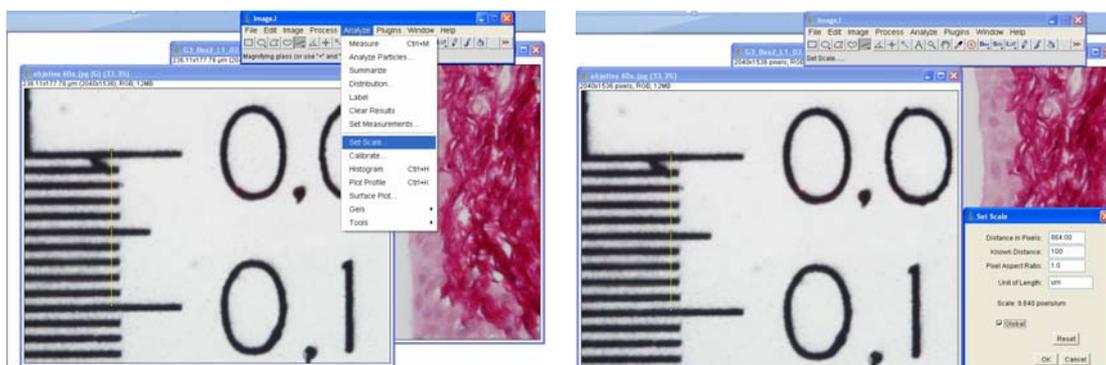


Figura 5 – B) Calibração para 2040 x 1536 (600x). Ajustes feitos com a ferramenta “Analyse / Set Scale”.

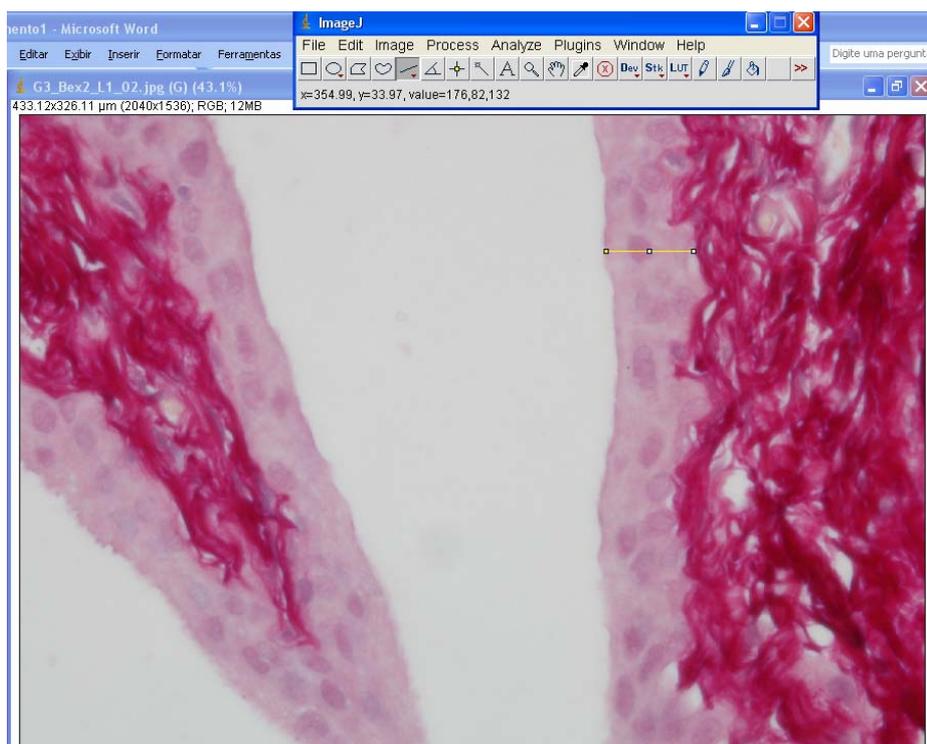


Figura 5 – C) Marcação da altura do epitélio para aferição.

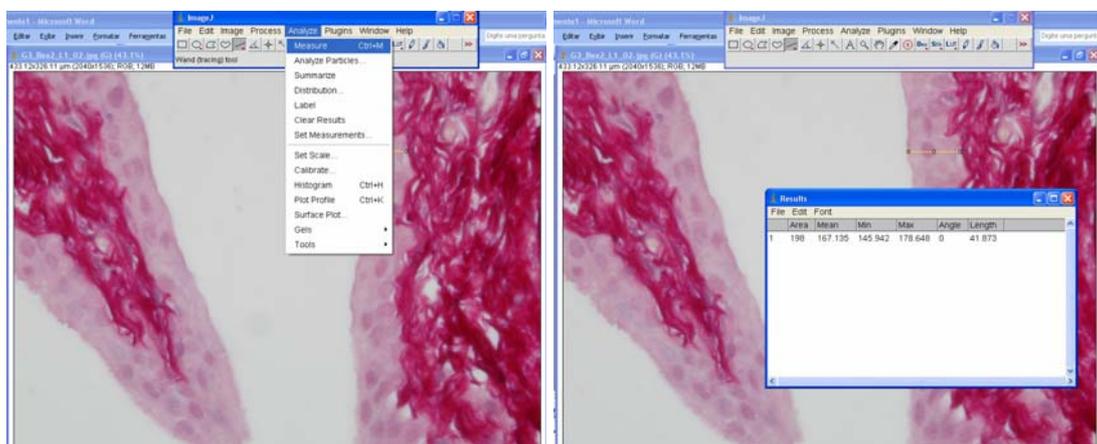


Figura 5 – D) Ferramenta “Measure” para obtenção do valor da altura do epitélio.

#### 1.7.4.3 Quantificação de fibras do sistema elástico

Foram obtidos 5 cortes histológicos da bexiga de cada animal (8 animais por grupo), sendo analisados 5 campos em cada corte, perfazendo um total de 25 campos em cada animal, totalizando 200 campos em cada grupo.

O software Image J versão 1.4 (NIH, Bethesda, USA), carregado com seu próprio “plugin” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>) foi usado para a quantificação das fibras do sistema elástico. Uma grade contendo 100 pontos foi sobreposta na fotografia digital dos campos obtidos das paredes das bexigas e, após a seleção da área na lâmina própria, foi feita a quantificação das fibras com a ajuda do “plugin cell counter“. As fibras do sistema elástico dos vasos da lâmina própria não foram quantificadas. (Figura – 6)

As médias obtidas por animal foram colocadas no programa GraphPad Prism 5.00 utilizando o tratamento estatístico da análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni's para comparações múltiplas.

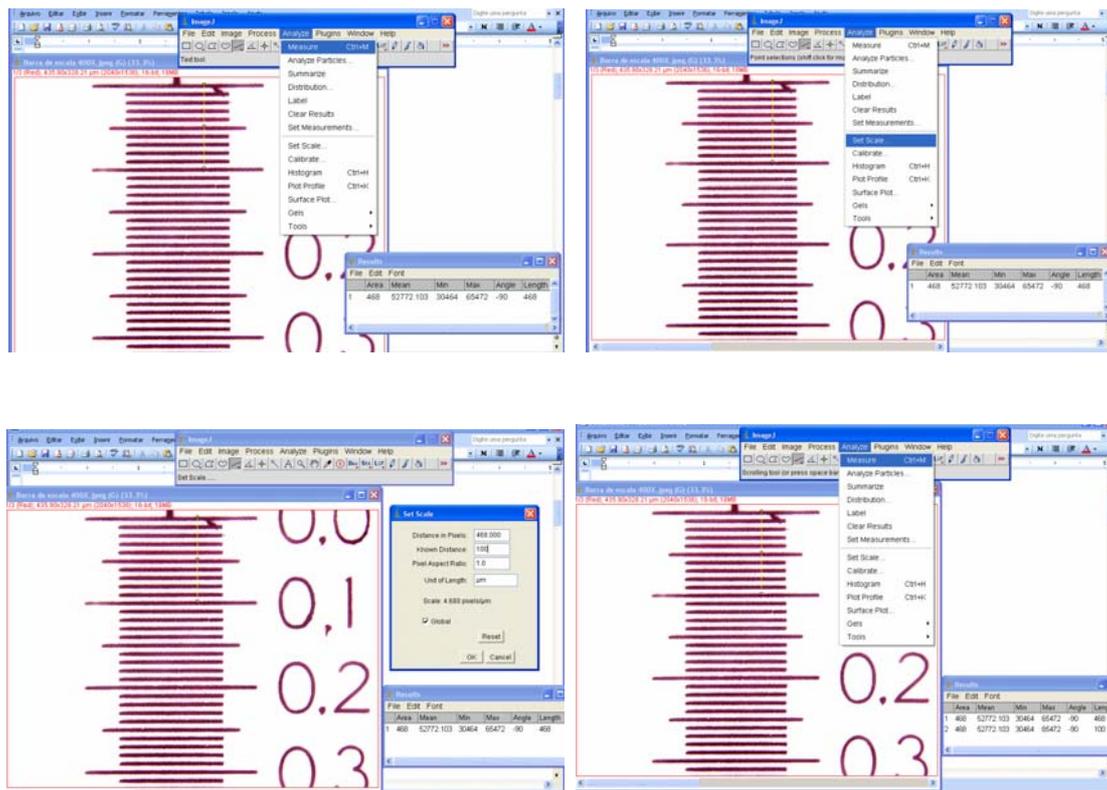


Figura 6 – A) Calibração para 2040 x 1536 (400x).

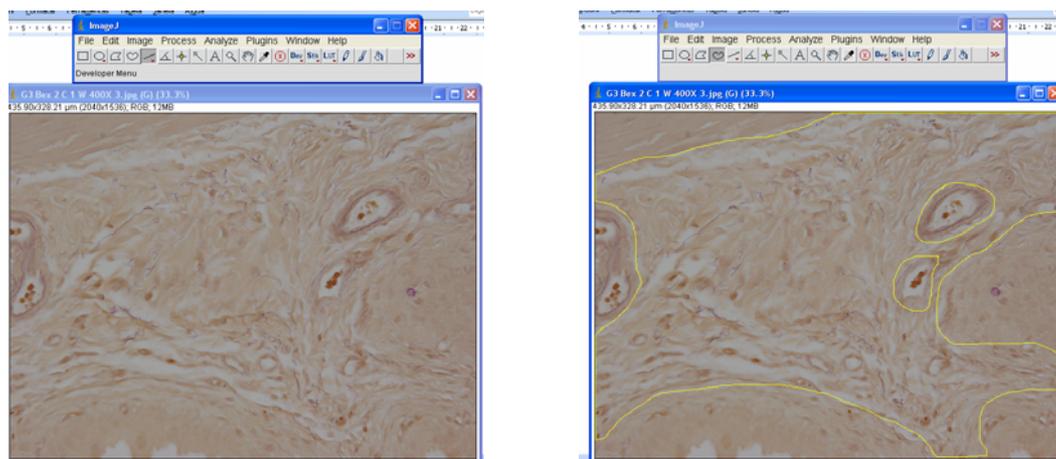


Figura 6 – B) Imagem que será analisada e marcação da lâmina própria.

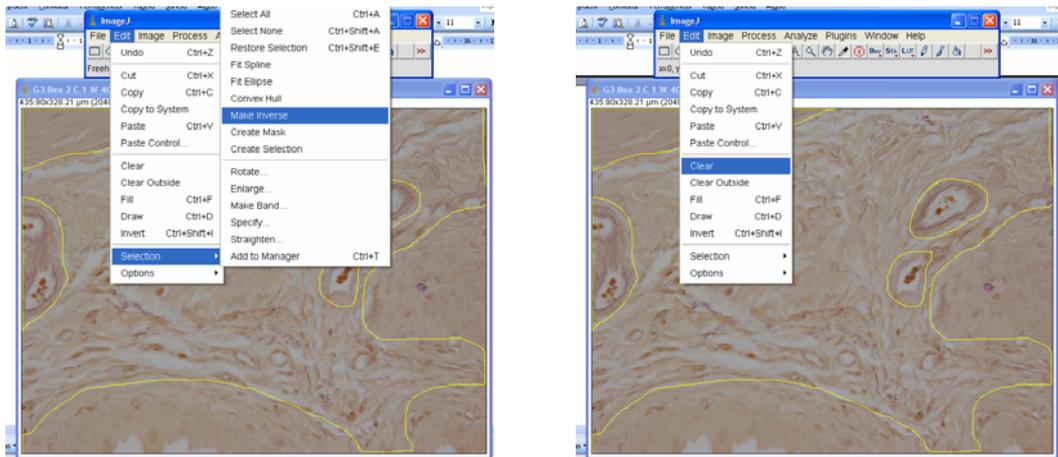


Figura 6 – C) Inversão da seleção para eliminar o que não fará parte da análise.

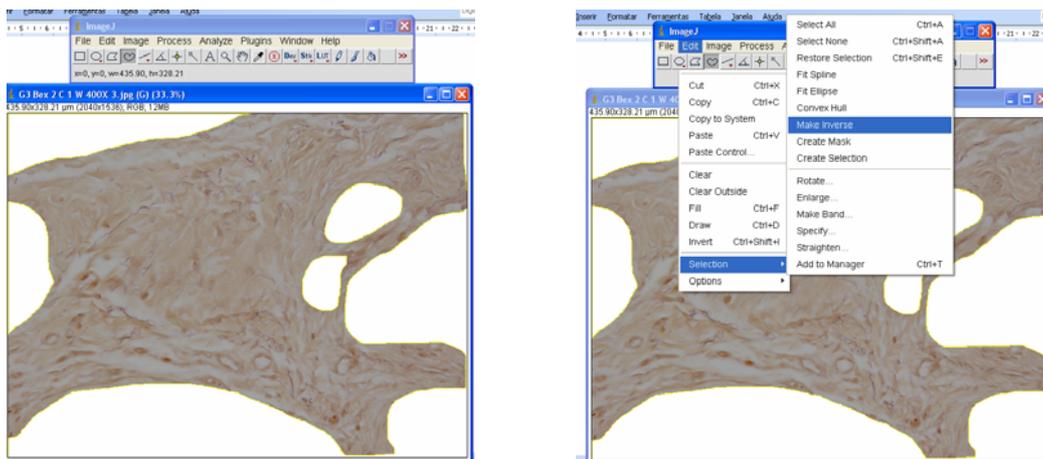


Figura 6 – D) Imagem somente com o que será analisado. Novamente, inversão para mensurar a área selecionada (lâmina própria).

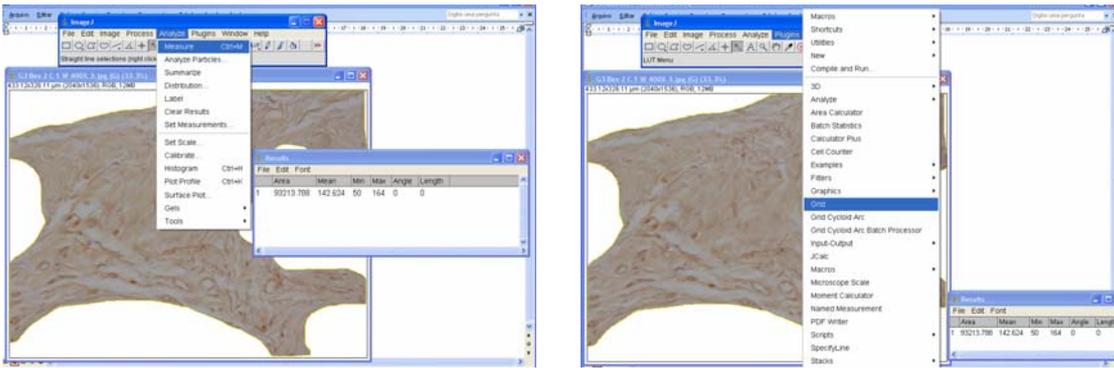


Figura 6 – E) Lâmina própria foi mensurada. Utilização do “Plugin grid” para inserir a grade.

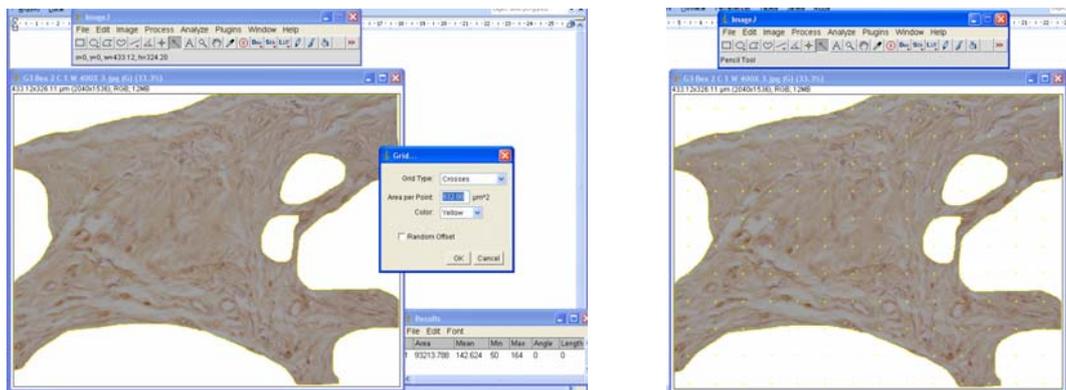


Figura 6 – F) Para avaliar o percentual de tecido elástico na lâmina própria, uma grade com cruces, foi colocada sobre o corte histológico, sendo que 100 cruces ficavam sobre a área de lamina própria previamente estipulada.

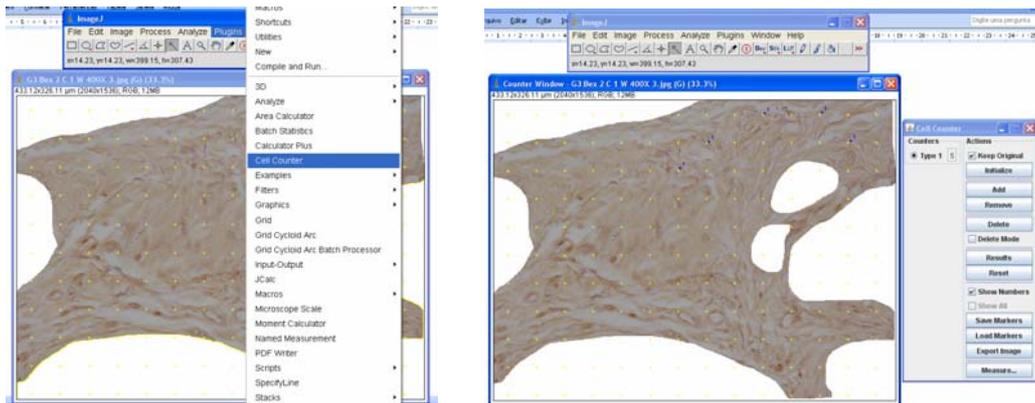


Figura 6 – G) Com a utilização do “plugin cell counter” foram marcadas as fibras que passavam no quadrante superior direito de cada cruz da grade. A partir do número de pontos selecionados, foi calculada a porcentagem de fibras do sistema elástico da área quantificada.

#### 1.7.4.4 Quantificação da área da parede da bexiga, colágeno e fibras musculares lisas

Nos cortes corados pelo método de vermelho de Picrosirius e capturados com objetiva de 20X, a área de superfície ocupada pela parede da bexiga, a área do colágeno e a área de músculo liso, foram analisadas pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 for Windows 98/NT/ 2000, utilizando uma técnica computacional baseada em segmentação de cores [33]. Estas áreas foram determinadas em porcentagem por diferentes gama de cores. Para cada imagem a relação entre as cores foi calculada pela subtração destas porcentagens. Foram obtidos 5 cortes histológicos da bexiga de cada animal (8 animais por grupo), sendo analisados 5 campos em cada corte, perfazendo um total de 25 campos em cada animal.

As médias obtidas por animal foram colocadas no programa GraphPad Prism 5.00 utilizando-se o tratamento estatístico da análise de variância (ANOVA) com pós-teste de comparação múltipla de Tukey.

#### 1.7.4.4.1 Quantificação da área da bexiga

Foram obtidos 5 cortes histológicos da bexiga de cada animal (8 animais por grupo), sendo analisados 5 campos em cada corte, perfazendo um total de 25 campos em cada animal e totalizando 200 campos em cada grupo.

Foi utilizada uma técnica computacional baseada em segmentação de cores, no software Image Pro Plus, para identificação do espaço ocupado pela parede da bexiga, em cada campo, e para todos os grupos, como descrito a seguir (Figura – 7):

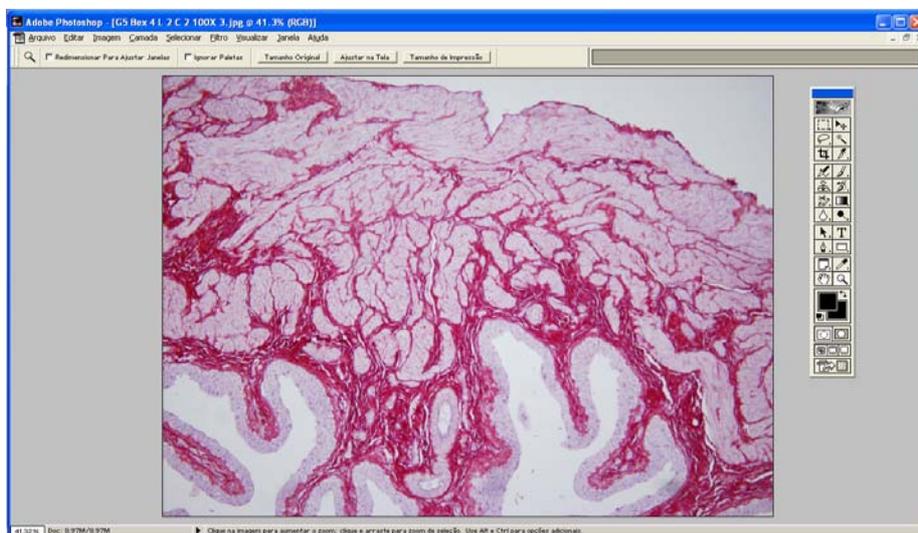


Figura 7 - A) Utilização do software Adobe Photoshop para visualização da fotomicrografia da parede da bexiga no campo previamente capturado.

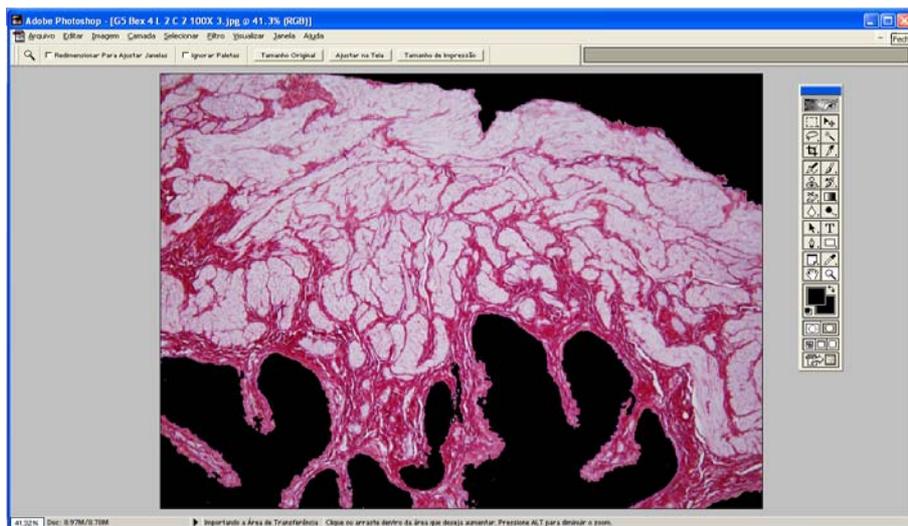


Figura 7 - B) Seleção do fundo com escurecimento do mesmo e retirada do urotélio, para obtenção de um campo específico apenas com a parede da bexiga, a ser utilizado pelo software Image-Pro Plus.

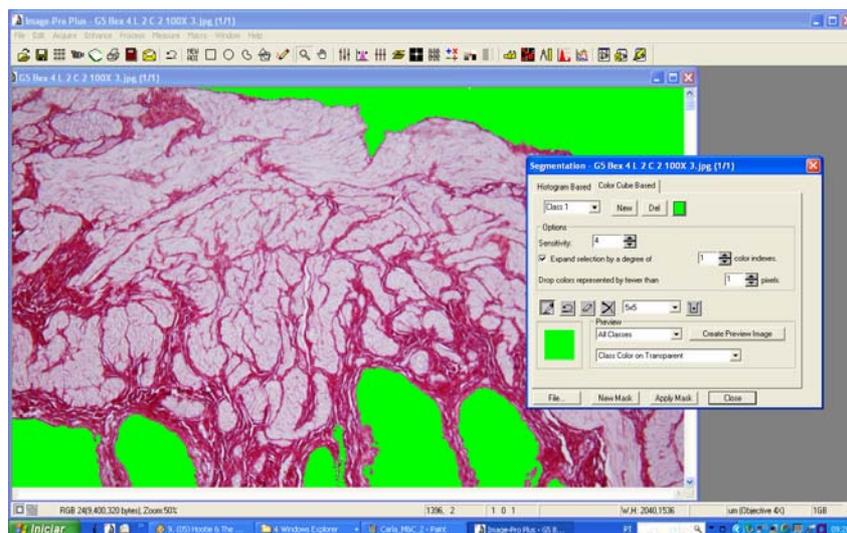


Figura 7 – C) Com a fotomicrografia da parede da bexiga sem o urotélio e com o fundo em preto, a imagem foi salva e aberta no software Image-Pro, para ser feita a avaliação da porcentagem que a parede da bexiga ocupava na fotomicrografia. A área marcada em preto foi transformada em verde, sendo utilizado a ferramenta “performance seguimentation”, com a finalidade de definir a área da bexiga.

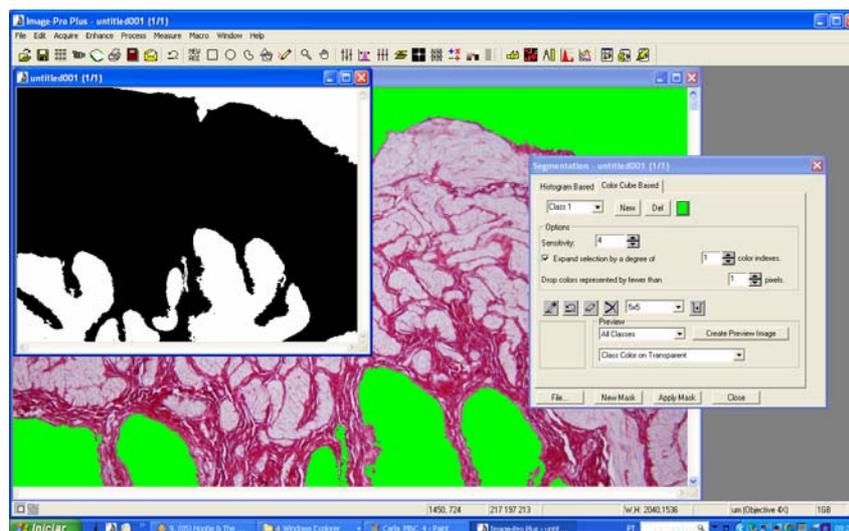


Figura 7 – D) Com a marcação feita em verde, foi criada uma máscara através do botão New Mask, visando a quantificação da área de bexiga.

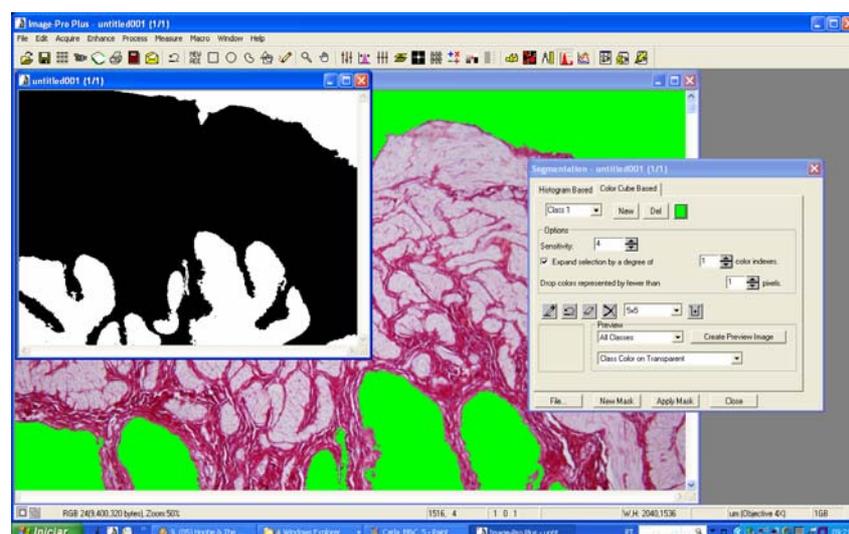


Figura 7 - E) Em branco a máscara e em preto a parte correspondente à parede da bexiga.

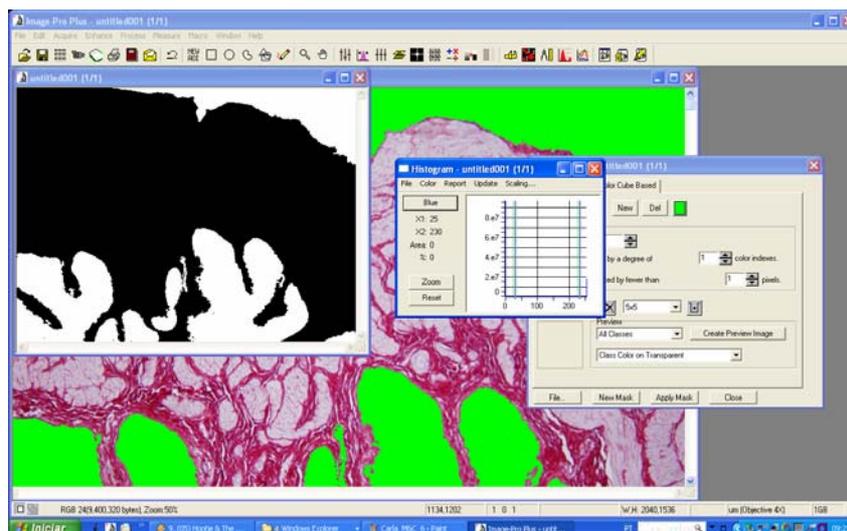


Figura 7 - F) Com a ferramenta “Histogram” foi realizada a mensuração da área. Inicialmente o histograma aparece com as marcações (em verde) significando as áreas limites para as cores preto (lado esquerdo) e branco (lado direito).

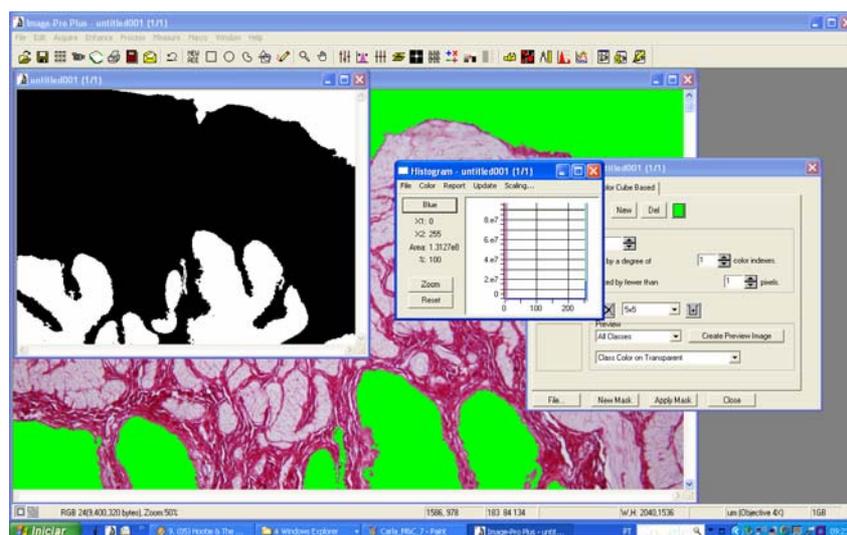


Figura 7 - G) O afastamento das linhas do “Histogram” para o limite máximo externo indica a área total correspondente ao campo todo da imagem, identificado na figura como 100%. Assim, foi avaliada a área em percentagem, que a bexiga ocupa na área total da imagem.

Os dados correspondentes à área da parede da bexiga, de cada rato, em cada grupo, foram lançados em uma tabela no software Microsoft Excel.

#### 1.7.4.4.2 Quantificação do colágeno e do músculo liso na parede da bexiga

Foram obtidos 5 cortes histológicos da bexiga de cada animal (8 animais por grupo), sendo analisados 5 campos em cada corte, perfazendo um total de 25 campos em cada animal e totalizando 200 campos em cada grupo.

O colágeno foi evidenciado pela sua cor em vermelho, utilizando o recurso de segmentação de cor do software Image Pro Plus. Após a evidenciação do colágeno foi criada uma máscara em preto e branco, delimitando em branco o colágeno e em preto o restante da imagem. Com o recurso do “histogram” foi obtida a porcentagem do colágeno (total de branco na imagem), que extraído da porcentagem correspondente à parede total, avaliado anteriormente, indicou a porcentagem de músculo liso na parede da bexiga, como descrito a seguir (Figura -8).

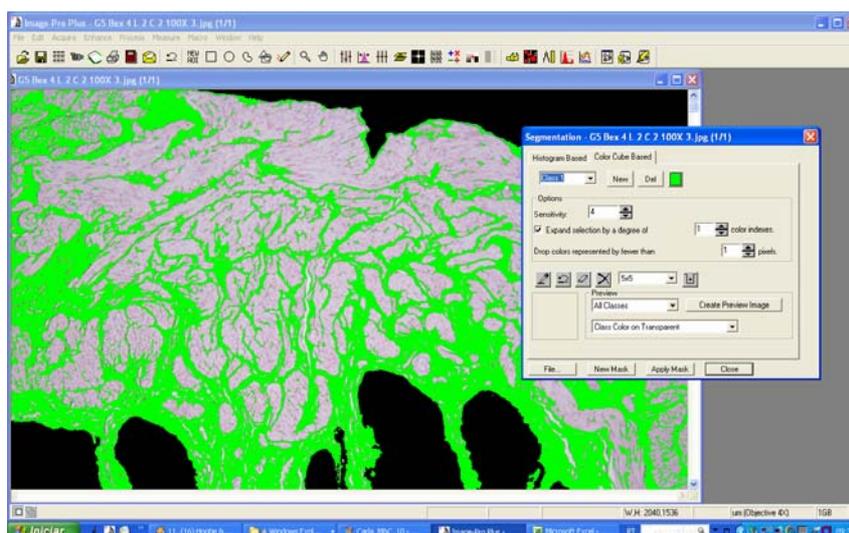


Figura 8 – A) Mesma imagem utilizada anteriormente na quantificação da parede da bexiga. Em verde, foi feita a marcação das áreas de cor vermelha na imagem original, que correspondiam ao colágeno.

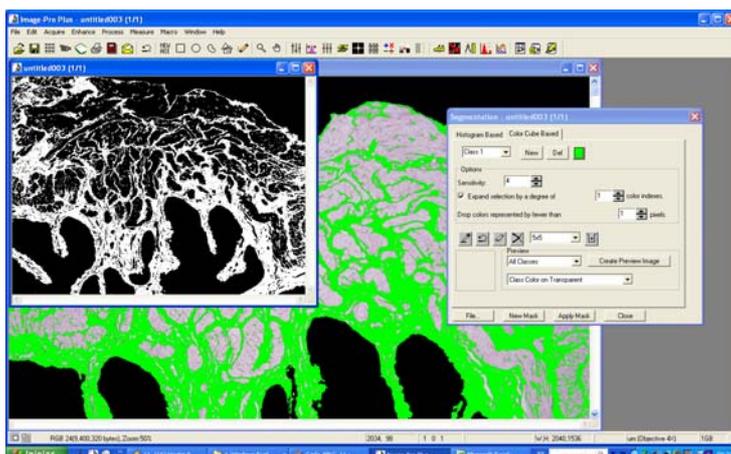


Figura 8 – B) Assim, foi criada uma máscara para calcular a área que o colágeno ocupava na bexiga, onde a cor branca era de interesse (colágeno).

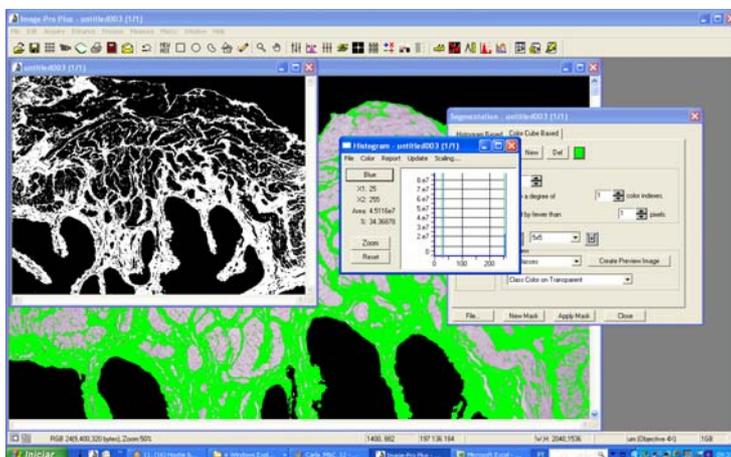


Figura 8 – C) Utilização do histograma para quantificação, com a marcação do colágeno em branco.

Os dados do colágeno foram inseridos em um planilha Excel, onde já constavam os resultados da área da parede da bexiga. A subtração entre ambos, gerou o quantitativo de músculo liso na parede vesical.

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPrism. Para análise de diferença foi usado a ANOVA e para determinar a diferença entre os grupos, foi aplicado o teste Tukey's. A demonstração do resultado final foi por gráficos.

#### 1.7.4.5 Quantificação de núcleos das fibras musculares lisas no detrusor

Foram obtidos 5 cortes histológicos da bexiga de cada animal (8 animais por grupo), sendo analisados 5 campos em cada corte, perfazendo um total de 25 campos em cada animal e totalizando 200 campos em cada grupo.

A contagem de núcleos foi feita utilizando a ferramenta de “plugin cell counter”, utilizando-se o software Image J versão 1.4 (NIH, Bethesda), carregado com seu próprio “plugin” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>) (Figura – 9 ) Foram feitas as medias e a densidade foi obtida dividindo-se o quantitativo de células pela medida da área da parede da bexiga por  $\text{mm}^2$ .

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPrism. Para análise de diferença foi usada ANOVA com pós teste de Bonferroni's para comparações múltiplas.

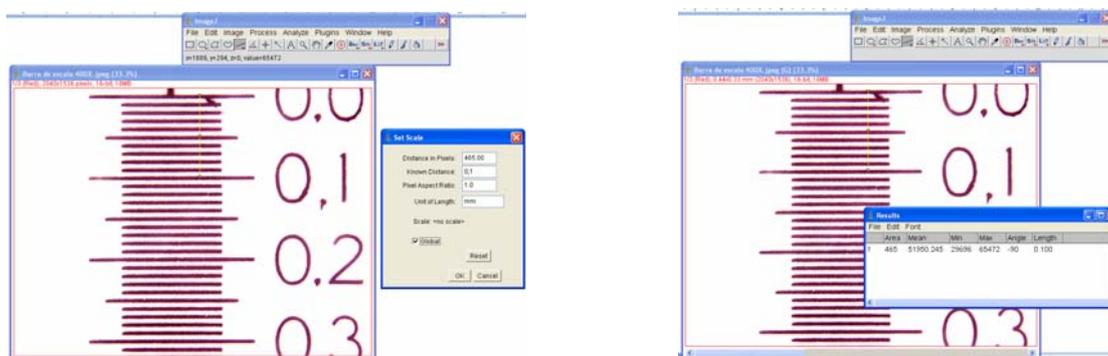


Figura 9 - A) Calibração utilizando a barra de escala de 2040 x 1536 (400x).



Figura 9 – B) Utilização do software Image J para visualização da fotomicrografia e contagem dos núcleos.

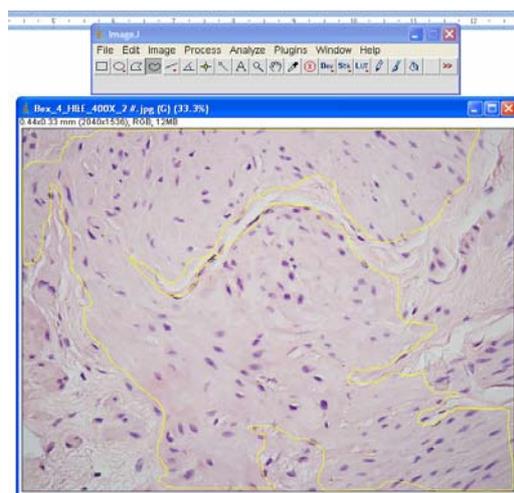


Figura 9 – C) Marcação da área para contagem.

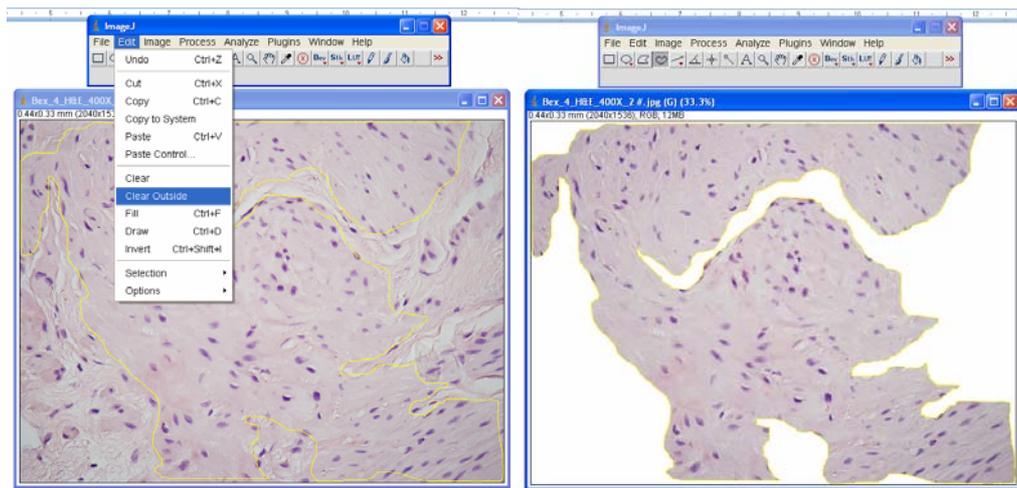


Figura 9 - D) Utilização da ferramenta “Clear outside” para remover a área que não será utilizada para contagem.

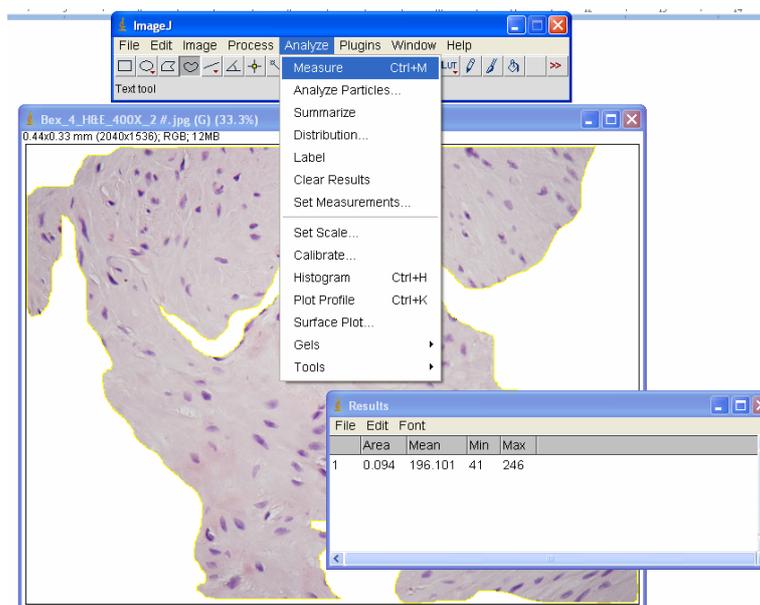


Figura 9 - E) Mensuração da área.

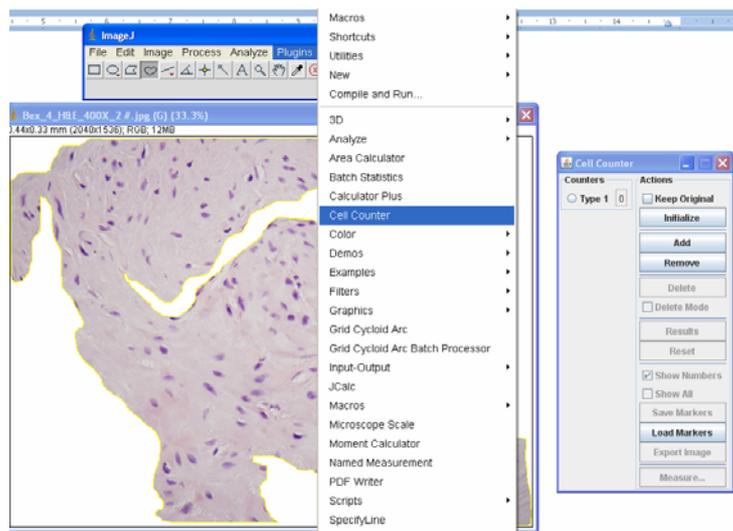


Figura 9 - F) Ferramenta “Cell Counter” utilizada para contagem.

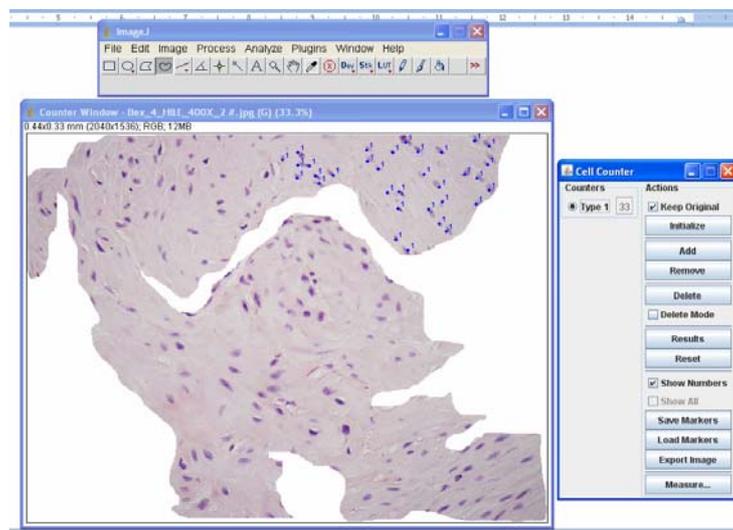


Figura 9 - G) Contagem de núcleos.

## 1.11 Análise bioquímica

### 1.11.1 Concentração do colágeno total na parede da bexiga

A técnica foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Matriz Extracelular da Unidade de Pesquisa Urogenital – UERJ. A concentração do colágeno total da bexiga foi determinada pela dosagem colorimétrica de hidroxiprolina. Dessa forma de 5 a 14 mg de tecido seco e delipidado foi hidrolisado em 6N HCl por 18 horas a 118°C como previamente descrito [34]. A dosagem foi realizada nos hidrolisados neutralizados usando o método da cloramina T [35] e os resultados foram expressos em µg de hidroxiprolina por mg de tecido seco e delipidado.

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPrism. Para análise de diferença foi usada ANOVA com pós teste de Bonferroni's para múltiplas comparações.

### **1.12 Microscopia eletrônica de varredura**

Para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizado o preparo da amostra com digestão celular [36]. Com auxílio de um estilete, foi retirado da amostra um fragmento com cerca de 2 mm de comprimento que foi fixado em glutaraldeído a 2,5 % por 24 h. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato por 3 vezes e submetido a uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 10% por 7 dias a 25°C, com troca diária da solução, o que levou à digestão celular. Após a digestão, o tecido foi lavado por várias horas em água destilada e a peça banhada em solução aquosa a 1% de ácido tânico (overnight). Este procedimento foi necessário para tornar as amostras mais resistentes e para aumentar a condutividade elétrica. O tecido foi novamente lavado em água destilada e pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio por 3 horas. A seguir foi feita uma desidratação em concentrações crescentes de etanol a 30% (15 min), 50% (15 min), 70% (min), 90% (15 min), 100% (30 min) e 100% (30 min). A secagem foi realizada em equipamento de ponto crítico Critical Point Dryer - Pelco CPD2 (Figura-10), onde, sob pressão, o etanol foi substituído pelo dióxido de carbono líquido, para completa desidratação da amostra.

Os fragmentos foram então montados em bases de alumínio e metalizadas com ouro no equipamento Cressington Stutier Coater 108 (Figura-11). O material foi então analisado em microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss Leo 435 (Figura-12) operado a 20 kV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica - LABMEL – UERJ.



Figura 10 - Aparelho de ponto crítico utilizado para desidratação sob pressão (Critical Point Dryer - Pelco CPD2).

**A****B**

Figura 11 - Processo de metalização. A) - Aparelho metalizador Cressington Stutier Coater 108. B) - Amostra metalizada, pronta para observação no microscópio de varredura.



Figura 12 - Observação da amostra em microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss Leo 435.

## 2 RESULTADOS

### 2.1 Testosterona sérica

O grupo castrado (C) apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos simulado (S) e castrado com reposição de testosterona (T).

O grupo S quando comparado ao grupo T não apresentou diferença significativa.

Foi constatado que a reposição hormonal com undecanoato de testosterona na dose única de 100 mg/kg por via subcutânea em ratos castrados foi eficiente para normalizar os níveis de testosterona no estudo realizado, pois não foi encontrada diferença significativa entre os grupos S e T, ao passo que o grupo C apresentou níveis séricos indetectáveis de testosterona (Figura-13).

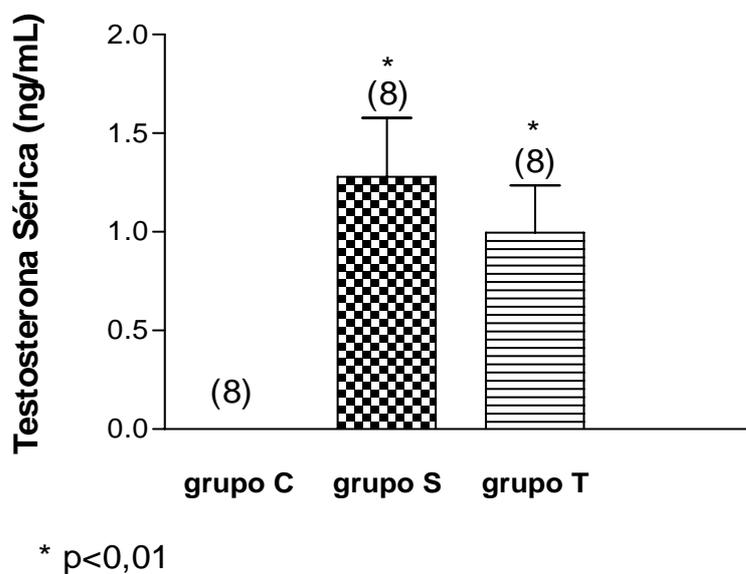


Figura 13 - Resultados para dosagem sérica de testosterona em ng/mL para os grupos castrado, simulado (sham) e castrado com reposição de testosterona. ANOVA com pós teste de Newman Keuls,  $p < 0,01$ .

## 2.2 Análise morfométrica, morfológica e bioquímica da parede da bexiga

### 2.2.1 Quantificação da altura do epitélio

Foi possível realizar a morfometria nas imagens coradas pelo vermelho de Picrosirius sem polarização. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura-14).

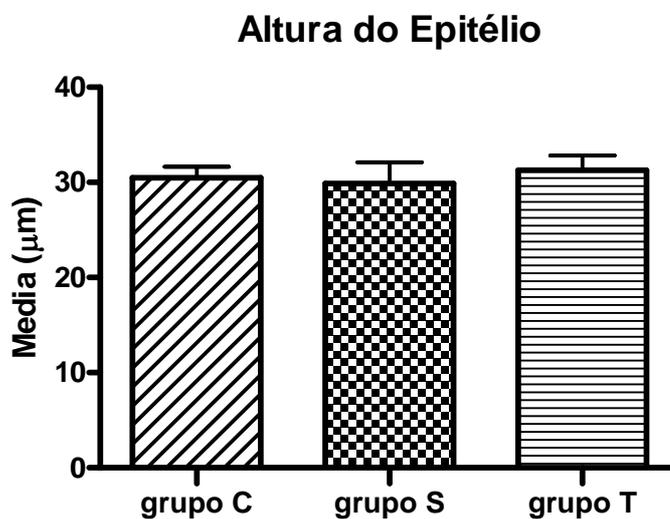


Figura 14 - Resultados para medida da altura do epitélio da bexiga em  $\mu\text{m}$  para os grupos Castrado (C), Simulado (S) e Castrado com reposição de testosterona (T). ANOVA; ( $p = 0,8369$ ).

### 2.2.2 Análise qualitativa do colágeno

Ao observarmos a lâmina própria e o músculo detrusor nas imagens coradas com vermelho de Picrosirius sob luz polarizada, foi possível constatar que o grupo castrado apresentou uma predominância de fibras de cor verde e os grupos simulado e castrados com reposição hormonal apresentaram uma predominância de fibras de cor vermelha (Figuras 15 e 16).

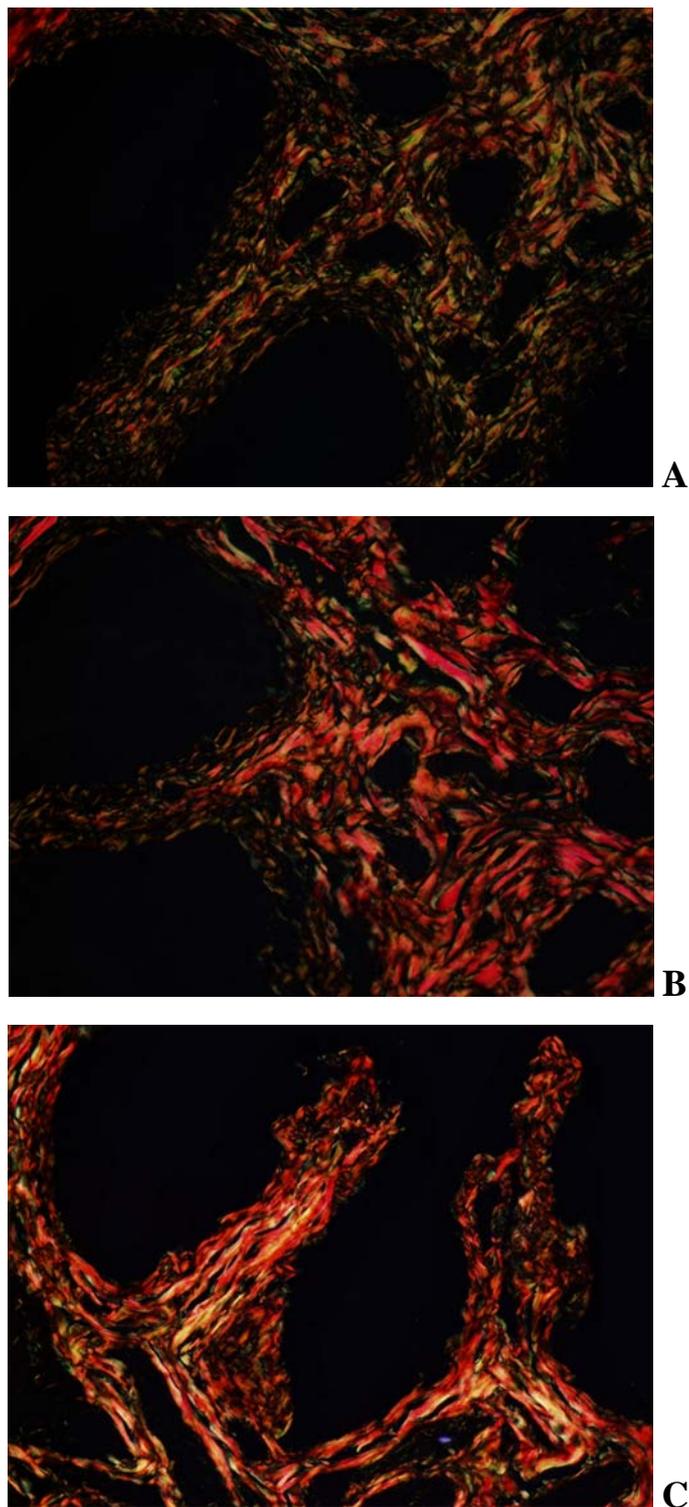


Figura 15 - Análise qualitativa do colágeno na lâmina própria. A) Grupo castrado (C). B) Grupo simulado (S). C) Grupo castrado com reposição de testosterona (T). Verifica-se que o grupo C apresentou predominância de fibras de cor verde e os grupos S e T apresentaram predominância de fibras de cor vermelha. Vermelho de Picosirius sob luz polarizada, X400.

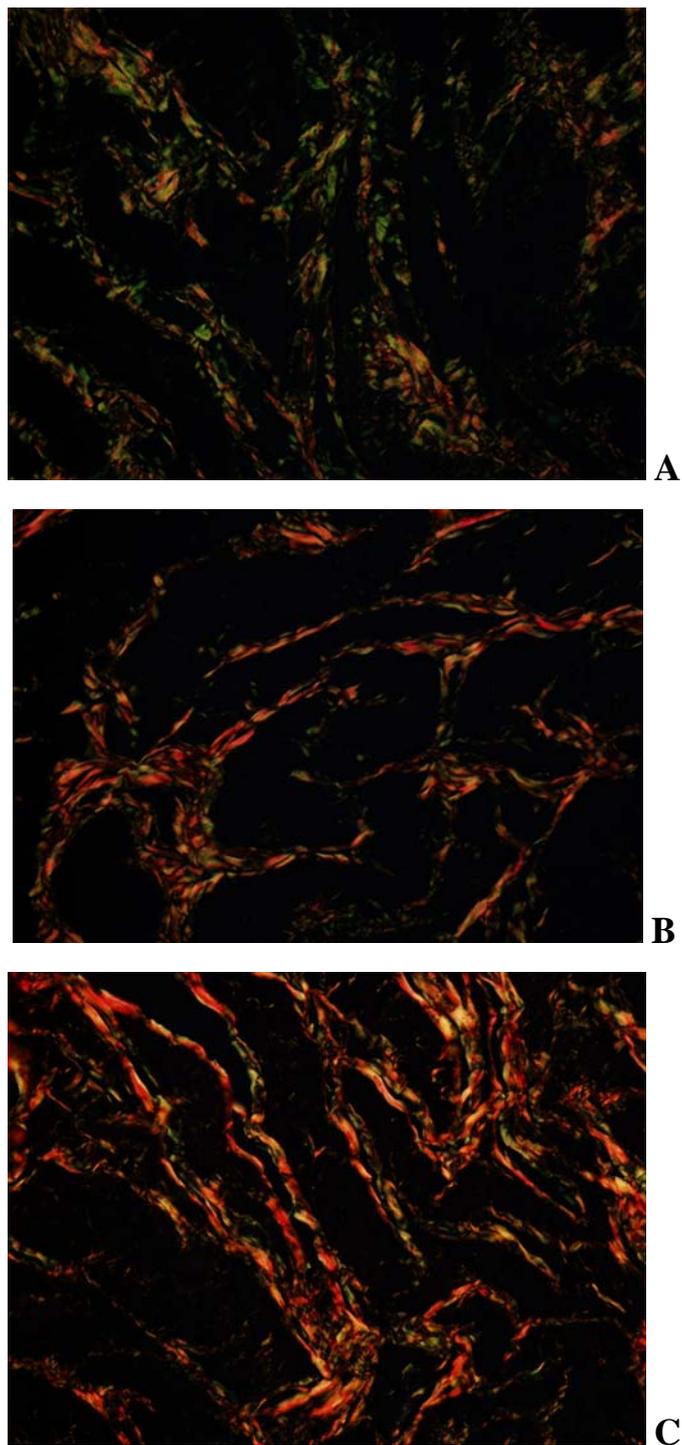


Figura 16 - Análise qualitativa do colágeno no músculo da bexiga (detrusor). A) Grupo castrado (C). B) Grupo simulado (S). C) Grupo castrado com reposição de testosterona (T). Verifica-se que o grupo C apresentou predominância de fibras de cor verde e os grupos S e T apresentaram predominância de fibras de cor vermelha. Vermelho de Picosirius sob luz polarizada, X400.

### 2.3 Quantificação do colágeno

Na quantificação do colágeno foi verificado que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura-17).

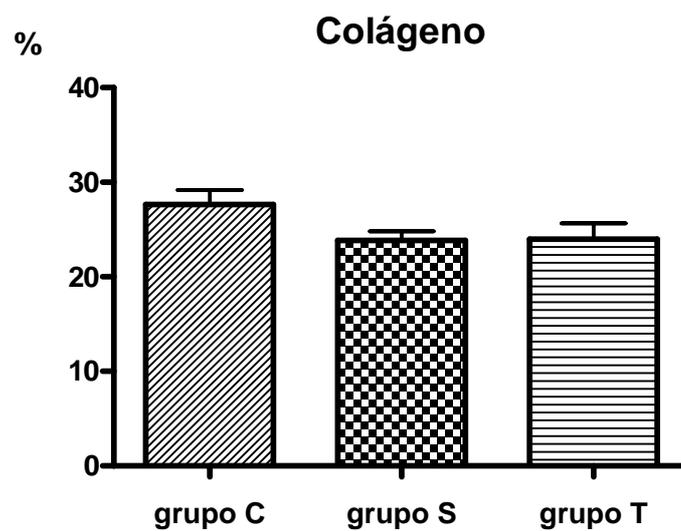


Figura 17 - Resultado da quantificação do colágeno na parede da bexiga. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA,  $p = 0,1412$ .

## 2.4 Quantificação bioquímica do colágeno total

Na quantificação bioquímica do colágeno total foi verificado que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura-18).

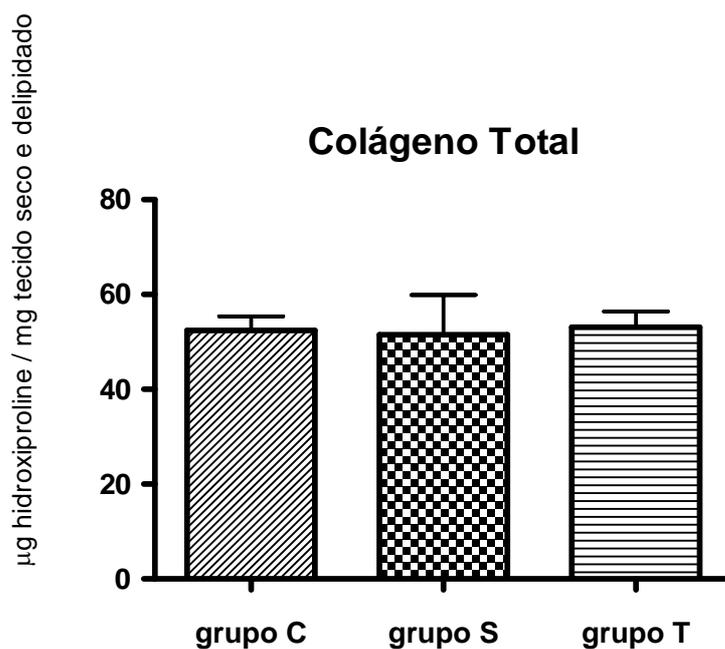


Figura 18 - Resultado da quantificação bioquímica do colágeno total na parede da bexiga. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA,  $p > 0,05$ .

## 2.5 Quantificação das fibras do sistema elástico

Na quantificação das fibras do sistema elástico foi verificado que o grupo castrado apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos simulado e castrado com reposição de testosterona (Figura-19).

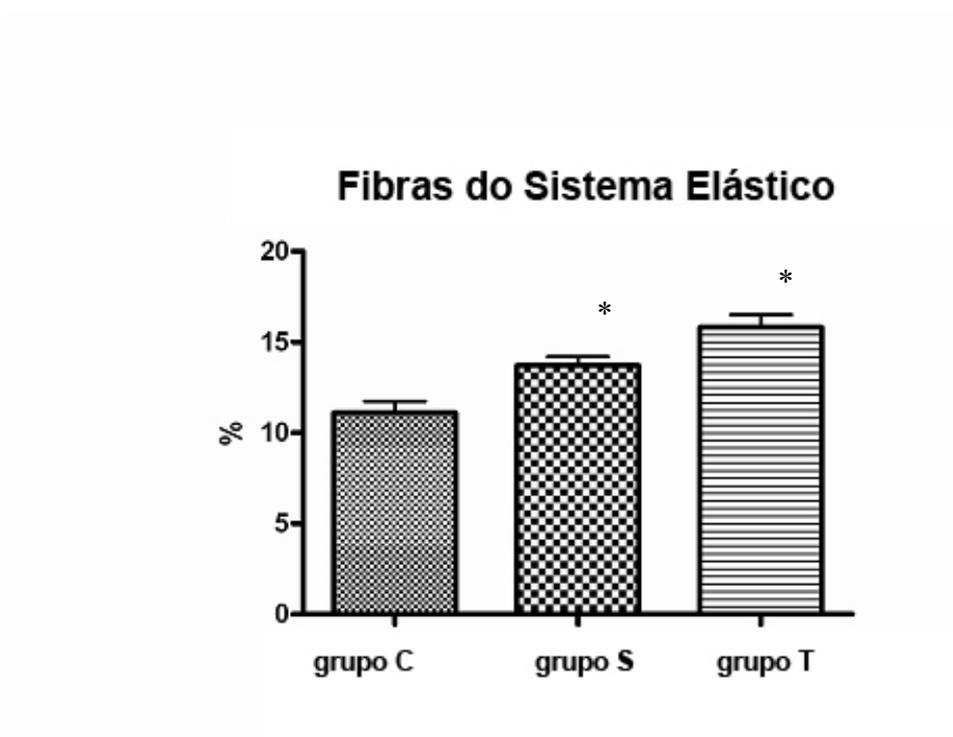


Figura 19 - Resultado da quantificação das fibras do sistema elástico na parede da bexiga. ANOVA com pós teste de Bonferroni's,  $p = 0,002$ .

## 2.6 Quantificação do músculo liso

Na quantificação do músculo liso, foram obtidos os seguintes resultados:

- O grupo castrado apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo simulado ( $p < 0,05$ ).
- O grupo castrado quando comparado ao grupo castrado com reposição de testosterona não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).
- O grupo simulado quando comparado ao grupo castrado com reposição de testosterona não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

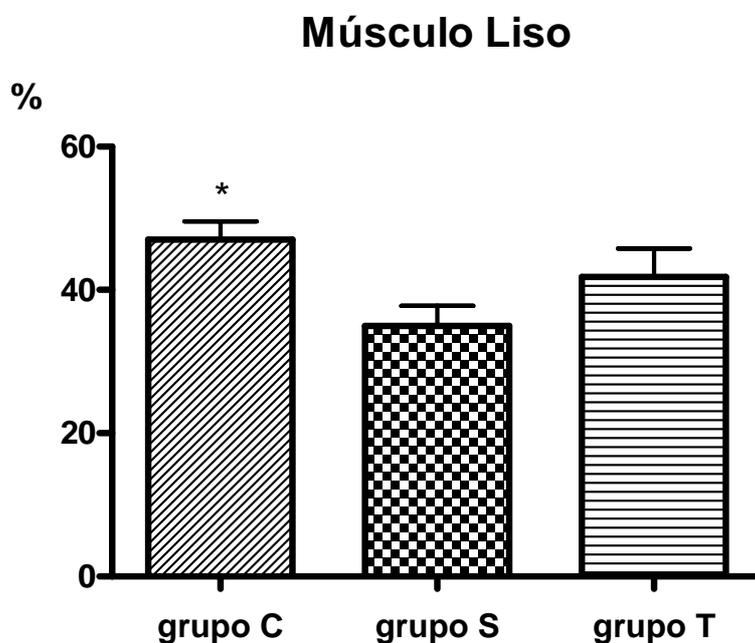


Figura 20 - Resultado da quantificação do músculo liso. O grupo castrado apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo simulado ( $p < 0,05$ ). O grupo simulado quando comparado ao grupo castrado com reposição de testosterona não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). (ANOVA com pós teste de Teste de Tukey)

## 2.7 Contagem de núcleos no músculo detrusor

Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos com relação ao número de núcleos de células musculares lisas no músculo da bexiga.

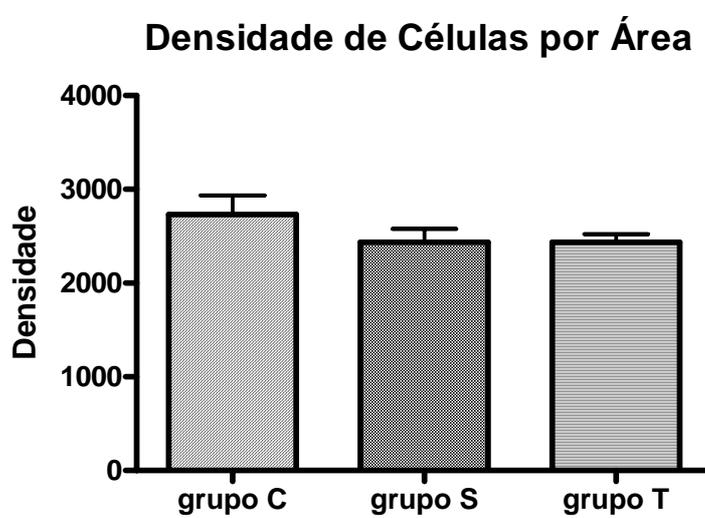


Figura 21 - Resultado da densidade de células musculares lisas por área no músculo da bexiga. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA,  $p = 0,3035$ .

## 2.8 Microscopia eletrônica de varredura

### 2.8.1 Caracterização das fibras colágenas

Grupo castrado - A microscopia eletrônica de varredura mostra uma organização de fibras com muitos espaços, apresentando um arranjo de fibras diferente dos demais grupos.

Grupo simulado e grupo castrado com reposição de testosterona – São identificadas grossas fibras colágenas, possivelmente caracterizando o colágeno tipo I, encontrando-se presentes juntamente com um emaranhado de fibras reticulares (colágeno tipo III). Pode-se observar também uma rede de fibras reticulares que se dispõem em diferentes direções (Figuras 22 e 23).

No geral, pode-se observar uma diferença entre o grupo castrado e os grupos simulado e castrado com reposição de testosterona. Nos grupos simulado e castrado com reposição de testosterona verificou-se uma organização mais semelhante, com fibras mais aglomeradas, indicando uma quantidade maior destas fibras, quando comparadas ao grupo castrado, Figuras 22 e 23.

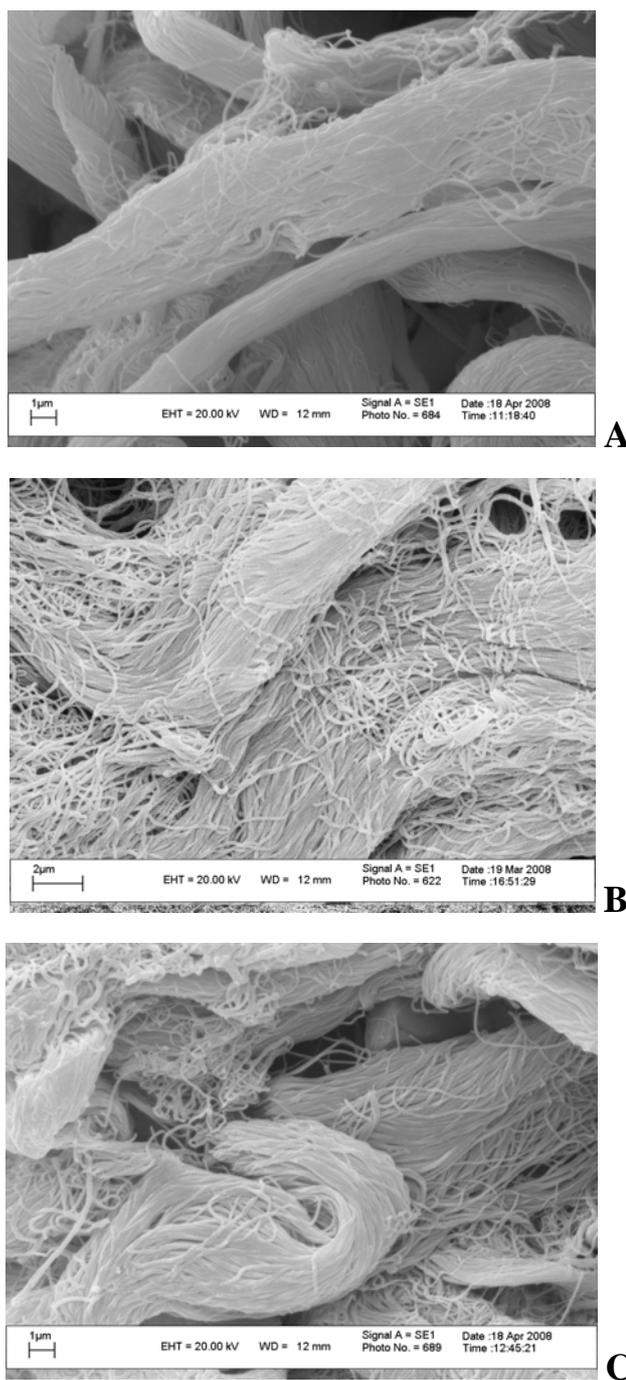
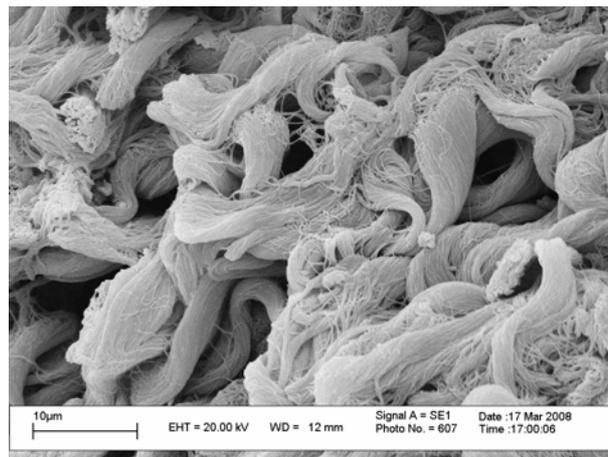
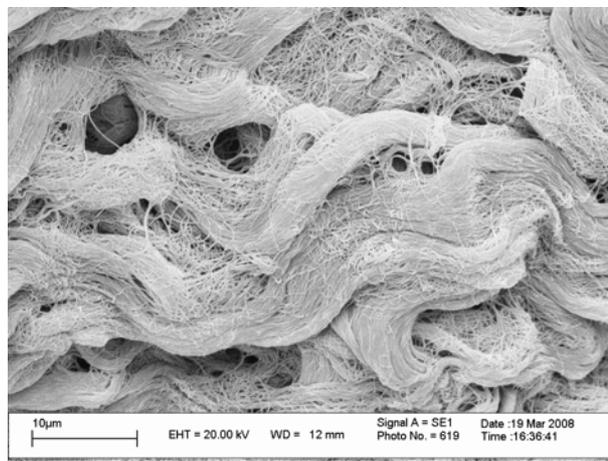


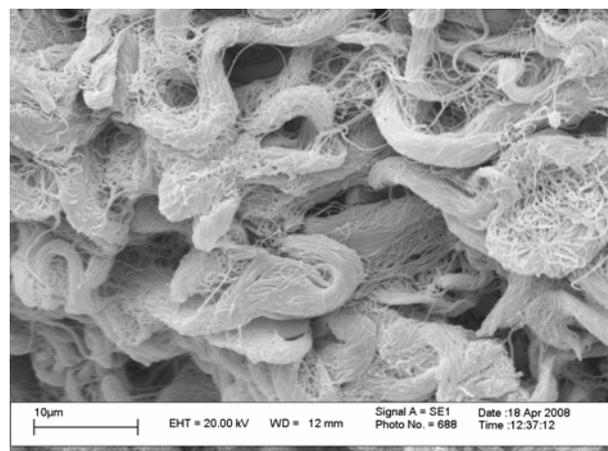
Figura 22 - Forma e arranjo das fibras colágenas observadas em microscopia eletrônica de varredura. Fibras colágenas em forma de corda emaranhadas na bexiga de ratos. Fibrilas colágenas muito finas formando uma rede. Zeiss Leo 435, X5000.



A



B



C

Figura 23 - Forma e arranjo das fibras colágenas observadas em microscopia eletrônica de varredura. A) Grupo castrado. B) Grupo simulado. C) Grupo castrado com reposição de testosterona. Fibras colágenas em forma de corda emaranhadas na bexiga de ratos. Fibrilas colágenas muito finas formando uma rede. Zeiss Leo 435, X2000.

### 3 DISCUSSÃO

O aumento da população na terceira idade, que levou à necessidade de uma qualidade de vida satisfatória, estimulou a procura de soluções que poderiam minorar as alterações secundárias ao processo de envelhecimento. Entre as alterações fisiológicas que afetam o homem na terceira idade, a deficiência androgênica é uma das mais importantes, e pode afetar diversos órgãos e sistemas. O uso da reposição hormonal em homens hipogonádicos já foi analisado em diferentes artigos [18, 19,21, 22, 28]. Estudos com animais demonstraram que a castração e a reposição hormonal estão relacionadas a alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais [37-42]. No entanto, a ação da testosterona nos diferentes órgãos do sistema urogenital ainda não é clara. A suplementação de androgênio durante o envelhecimento de indivíduos do sexo masculino parece ter efeito sobre a próstata e o pênis, onde a diminuição progressiva de testosterona traria como resultado a disfunção erétil [43-46]. Trabalhos relacionados à diminuição de testosterona e suas conseqüências na bexiga são mais raros. O trabalho de Chang et al. (2009) [47] sugeriu que a deficiência de testosterona pode ser o mecanismo fisiopatológico que explicaria os sintomas do trato urinário inferior e a síndrome metabólica no homem. Porém, dados quantitativos precisos sobre os efeitos da testosterona na parede vesical, particularmente no músculo detrusor e na matriz extracelular, ainda não foram determinados.

Nos anos recentes, apareceram indícios de que a manutenção de uma função vesical satisfatória em homens na terceira idade depende não somente de um fluxo urinário livre (desobstruído), mas também de um trofismo vesical e uretral, que pode ser dependente de androgênios e que pode ser afetado por níveis séricos baixos destes hormônios [26-28].

No presente estudo experimental, a análise dos níveis séricos de testosterona em ratos normais e castrados, nos permitiram testar a hipótese de que variações nos níveis hormonais poderiam determinar alterações estruturais na bexiga urinária de ratos machos. Também, a reposição hormonal realizada neste estudo, serviu para investigar se as alterações estruturais causadas pela deficiência de testosterona poderiam ser revertidas. Assim, além de determinar as possíveis alterações na parede vesical, verificou-se também se as estruturas analisadas estariam crônica e definitivamente afetadas pela carência hormonal. Para tanto, procurou-se estabelecer através de dados

morfológicos, morfométricos e bioquímicos, a ação da testosterona nos diferentes elementos da parede vesical em ratos controle, ratos castrados e ratos submetidos a reposição de testosterona, caracterizando o substrato morfológico sobre o qual ocorre a ação deste hormônio.

No resultado da avaliação da altura do epitélio da bexiga, em material corado pelo vermelho de Picrosirius sem polarização, não foram observadas diferenças significativas entre os 3 grupos estudados. Assim, a carência de testosterona motivada pela castração, parece não ter afetado de forma significativa o epitélio vesical.

Na análise qualitativa do colágeno, tanto na lâmina própria quanto no músculo da bexiga, verificamos que no material corado pelo vermelho de Picrosirius sob luz polarizada, o grupo castrado apresentou uma predominância de fibras coradas em verde, ao passo que o grupo controle e o grupo com reposição hormonal apresentaram predominância de cor vermelha. A cor verde indica uma concentração de colágeno tipo-III, mostrando um “turnover” do colágeno na bexiga dos ratos castrados. Por outro lado, nos ratos que sofreram reposição hormonal, a predominância de vermelho indica uma maior concentração de colágeno tipo-I, semelhante ao encontrado em controles, o que sugere que a testosterona atua na polimerização do colágeno, semelhante aos controles. Isto também mostrou que a reposição hormonal, mesmo instituída em fases mais tardias, levou à reversão das alterações qualitativas no colágeno da bexiga, semelhante ao que já havia sido descrito para o corpo cavernoso do pênis [30]. Também, a análise qualitativa do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, mostra no grupo castrado um arranjo do colágeno com fibras apresentando muitos espaços entre as mesmas, diferente do grupo simulado e do grupo com reposição de testosterona. Por este método foi observado que a reposição hormonal levou a reversão das alterações estruturais do colágeno.

Com relação à quantificação computadorizada do colágeno na parede da bexiga, não encontramos diferença significativa entre os grupos. Estes achados diferem em parte ao que foi apresentado previamente para o corpo cavernoso de ratos [30], onde foi observada uma diminuição dos valores absolutos para o colágeno total nos corpos cavernosos de ratos castrados. Também, a análise bioquímica da concentração do colágeno total da bexiga, determinada pela dosagem colorimétrica de hidroxiprolina, demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Assim, na bexiga, o colágeno parece não ter sido afetado de modo significativo pela privação hormonal, pelo menos quantitativamente, como mostraram os resultados

obtidos tanto pela análise bioquímica como pela quantificação computadorizada. Ambos os métodos comprovaram que a quantidade de colágeno é aproximadamente a mesma nos três grupos analisados. No entanto, a observação do colágeno sob luz polarizada pela técnica do Picrosirius, mostrou que existe uma modificação no tipo de colágeno que parece ocorrer nos indivíduos castrados. Apesar do método de vermelho de Picrosirius não ser preciso para determinar o tipo de colágeno, é possível supor que a testosterona possa de alguma forma atuar sobre a síntese do colágeno modificando não a quantidade, mas a qualidade do mesmo.

Na quantificação por estereologia das fibras do sistema elástico, foi constatado que o grupo castrado apresentou diminuição significativa das fibras elásticas quando comparado ao grupo simulado e ao grupo com reposição de testosterona. Isto poderia acarretar perda da elasticidade da parede vesical, o que poderia explicar, em parte, as características miccionais frequentemente observadas nos indivíduos idosos. A reposição da testosterona parece promover o restabelecimento da síntese de elastina, revertendo as alterações do sistema elástico na parede da bexiga. Este fato contribuiria para o restabelecimento da normalidade miccional pelo aumento da complacência vesical.

A análise quantitativa do músculo detrusor mostrou um aumento da massa muscular por unidade de área nos indivíduos castrados. A reposição com testosterona foi capaz de reverter esta alteração, de tal maneira que o grupo simulado e o grupo com reposição hormonal não apresentaram diferença estatisticamente significativa na quantificação muscular. Interessantemente, a contagem de núcleos das células musculares nas áreas previamente analisadas nos três grupos não apresentou variação. Este fato mostra de forma clara que não ocorreu um aumento no número das fibras, mas uma hipertrofia das fibras musculares lisas. O fato de a reposição hormonal ter revertido as alterações musculares da bexiga, voltando a ser semelhante a do grupo simulado, deve fazer com que ocorra uma diminuição da pressão do detrusor e possivelmente restabeleça as condições de normalidade.

As alterações estruturais previamente descritas em ratos com hipogonadismo secundário podem explicar em parte as alterações miccionais observadas com o envelhecimento em homens. Já foi descrito clinicamente que o envelhecimento e a diminuição de testosterona contribuem para a freqüência urinaria, causando desconforto em homens idosos [25]. Também, como citado previamente, Koristsiadis et al. (2008) [26] demonstraram em humanos que baixos níveis de testosterona em pacientes com

obstrução ao fluxo vesical correlacionaram negativamente com a pressão ao final da micção e com a pressão do detrusor ao fluxo máximo, assim como promoveram hiperatividade do detrusor. Concluíram que os androgênios parecem ter um papel de melhorar a função do trato urinário inferior.

Foi demonstrado em estudos com humanos, que além de melhorar a função sexual, a terapia de reposição com testosterona pode também melhorar os sintomas do trato urinário inferior e função vesical. Esta melhora é através do aumento da complacência e da capacidade da bexiga e diminuição da pressão do detrusor ao fluxo máximo em homens com hipogonadismo sintomático de aparecimento tardio [27,28].

O nosso presente estudo experimental sugere que, além de melhorar a função sexual, a terapia de reposição hormonal com testosterona pode melhorar a função e a complacência vesical em indivíduos com hipogonadismo secundário.

#### 4 CONCLUSÕES

A orquiectomia experimental em ratos foi capaz de levar a testosterona sérica a níveis indetectáveis.

A reposição hormonal com undecanoato de testosterona foi eficiente para normalizar os níveis séricos de testosterona.

O hipogonadismo experimental em ratos levou a alterações estruturais de diversos elementos da parede da bexiga, como colágeno, sistema elástico e músculo liso.

A reposição hormonal com undecanoato de testosterona levou à reversão das alterações estruturais da parede da bexiga em ratos com hipogonadismo secundário.

**REFERÊNCIAS**

1. Lunenfeld B: Androgen therapy in the aging male. *World J Urol.* 2003; 21: 292.
2. Abdo CH, Afif-Abdo J: Estudo populacional do envelhecimento (EPE): primeiros resultados masculinos. *RBM.* 2007; 64: 379-383.
3. Gaylis FD, Lin DW, Ignatoff JM, Amling CL, Tutrone RF, Cosgrove DJ. Prostate cancer in men using testosterone supplementation. *J Urol.* 2005 Aug;174:534-8.
4. Slater S, Oliver RTD: Testosterone: Its role in development of prostate cancer and potential risk from use as hormone replacement therapy. *Drugs Aging.* 2000; 17: 431-439.
5. Kaufman JM, Graydon RJ: Androgen replacement after curative radical prostatectomy for prostate cancer in hypogonadal men. *J Urol.* 2004; 172: 920-922.
6. Gould DC, Kirby RS: Testosterone replacement therapy for late onset hypogonadism: what is the risk of inducing prostate cancer? *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2006; 9: 14-18.
7. Teloken C, Da Ros CT, Caraver F, Weber FA, Cavalleiro AP, Graziottin TM: Low serum testosterone levels are associated with positive surgical margins in radical retropubic prostatectomy: hypogonadism represents bad prognosis in prostate cancer. *J Urol.* 2005; 174: 2178-80.
8. Rhoden EL, Morgentaler A: Results of prostate biopsy in men with low serum testosterone. *J Urol.* 2003; 169: 461-461.
9. Morales A, Heaton JP, Carson CC 3rd. Andropause: a misnomer for a true clinical entity. *J Urol.* 2000;163:705-12.
10. Wang C, Swedloff RS, Iranmanesh A, Dobs A, Snyder PJ, Cunningham G, et al. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. Testosterone Gel Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:2839-53.
11. Hwang TIS, Lin Y-C: The relationship between hypogonadism and erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research.* 2008;20: 231-5.
12. Araujo AB, O'Donnell AB, Brambilla DJ et al: Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men: estimates from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5920.

13. Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA: Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*. 2003; 144: 2195-200.
14. Trayhurn P, Wood IS: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004; 92: 347-55.
15. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ: The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; 365: 1415-28.
16. Holden CA, McLachlan RI, Pitts M, Cumming R, Wittert G, Agius PA, Handelsman DJ, de Kretser DM: Men in Australia Telephone Survey (MATEs): a national survey of the reproductive health and concerns of middle-aged and older Australian men. *Lancet*. 2005; 366: 218-24.
17. Makhsida N, Shah J, Yan G, Fisch H, Shabsigh R: Hypogonadism and metabolic syndrome: implications for testosterone therapy. *J Urol*. 2005; 174: 827-34.
18. Naharci MI, Pinar M, Bolu E, Olgun A: Effect of testosterone on insulin sensitivity in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr Pract*. 2007; 13: 629-35.
19. Yeap B Dr, Chubb P, Hyde Z, Jamrozik K, Hankey G, Flicker L, Norman P: Lower serum testosterone is independently associated with insulin resistance in non-diabetic older men. The Health In Men Study. *Eur J Endocrinol*. 2009 [Epub ahead of print].
20. Zitzmann M, Nieschlag E: Androgen receptor gene CAG repeat length and body mass index modulate the safety of long-term intramuscular testosterone undecanoate therapy in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 3844-53.
21. Yeap BB, Hyde Z, Almeida OP, Norman PE, Chubb SA, Jamrozik K, Flicker L, Hankey GJ: Lower testosterone levels predict incident stroke and transient ischemic attack in older men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94: 2353-9.
22. Traish AM, Saad F, Feeley RJ, Guay AT: The dark side of testosterone deficiency: III. Cardiovascular disease. *J Androl*. 2009 [Epub ahead of print]
23. Cayan F, Tek M, Balli E, Oztuna S, Karazindiyanoglu S, Cayan S: The effect of testosterone alone and testosterone + estradiol therapy on bladder functions and smooth muscle/collagen content in surgically menopause induced rats. *Maturitas*. 2008; 60: 248-52.

24. Rekers H, Drogendijk AC, Valkenburg HA, et al. The menopause, urinary incontinence and other symptoms of the genito-urinary tract. *Maturitas*, 1992;15:101.
25. Yassin AA, Saad F, Gooren LJ. Metabolic syndrome, testosterone deficiency and erectile dysfunction never come alone. *Andrologia*. 2008;40:259-64.
26. Koritsiadis G, Stravodimos K, Mitropoulos D, Doumanis G, Fokitis I, Koritsiadis S, Constantinides C: Androgens and bladder outlet obstruction: a correlation with pressure-flow variables in a preliminary study. *BJU Int*. 2008; 101: 1542-6.
27. Karazindiyanoglu S, Cayan S: The effect of testosterone therapy on lower urinary tract symptoms/bladder and sexual functions in men with symptomatic late-onset hypogonadism. *Aging Male*. 2008; 11: 146-9.
28. Pradidarcheep W: Lower urinary tract symptoms and its potential relation with late-onset hypogonadism. *Aging Male*. 2008; 11: 51-5.
29. Haider A, Gooren LJ, Padungtod P, Saad F: Concurrent improvement of the metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms upon normalisation of plasma testosterone levels in hypogonadal elderly men. *Andrologia*. 2009; 41: 7-13.
30. Miranda A: Efeitos da castração e reposição hormonal tardia no tecido erétil do penis de ratos Sprague-Dawley. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ. Rio de Janeiro, 2009, pp.95.
31. Callies F, Kollenkirchen U, von zur Muhlen C et al.: Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003;111: 203.
32. Teixeira CV, Silandre D, de Souza Santos AM, Delalande C, Sampaio FJ, Carreau S, da Fonte Ramos C: Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol*. 2007;192:301-11.
33. Lehr H, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM.: Complete Chromogen Separation and Analysis in Double Immunohistochemical Stains Using Photoshop-based Image Analysis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1999;47: 119–25.
34. Cabral CA, Sampaio FJ, Cardoso LE: Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of

- changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol.* 2003;170:2512-6.
35. Bergman I., Loxley R.: Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. *Anal. Chem.* 1963; 35:1961-5.
  36. Ohtani O, Ushiki T, Taguchi T, Kikuta A: Collagen fibrillar networks as skeletal frame-works: A demonstration by cell maceration/ Scanning electron microscope method. *Arch Histol Cytol.* 1988; 51:249-61.
  37. Alcorn JF, Toepfer JR, Leipheimer RE: The effects of castration on relaxation of rat corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J Urol.* 1999; 161: 686-9.
  38. Dai YT, Stopper V, Lewis R, Mills T: Effects of castration and testosterone replacement on veno-occlusion during penile erection in the rat. *Asian J Androl.* 1999; 1: 53-9.
  39. Gooren LJ, Saad F: Recent insights into androgen action on the anatomical and physiological substrate of penile erection. *Asian J Androl.* 2006; 8: 3-9.
  40. Heaton JP, Varrin SJ: Effects of castration and exogenous testosterone supplementation in an animal model of penile erection. *J Urol.* 1994; 151: 797-800.
  41. Li Z, Wang YX, Zheng S, Xiang ZQ, Han YF: The effects of testosterone undecanoate on relaxation of rat corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2002; 8: 130-3.
  42. Shen ZJ, Zhou XL, Lu YL and Chen ZD: Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian J Androl.* 2003; 5: 33-6.
  43. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, Chen X, Yarasheski KE, Magliano L, Dzekov C: Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281: E1172-81.
  44. Lunenfeld B: Androgen therapy in the aging male. *World J Urol.* 2003; 21: 292-305.
  45. Morales A, Heaton JP: Hypogonadism and erectile dysfunction: pathophysiological observations and therapeutic outcomes. *BJU Int.* 2003; 92: 896-9.
  46. Morales A, Lunenfeld B: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. *Aging Male.* 2002; 5: 74-86.

47. Chang IH, Oh SY, Kim SC: A possible relationship between testosterone and lower urinary tract symptoms in men. *J Urol.* 2009; 182:215-20.

# **ANEXO**



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES  
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/231/2008** sobre "**Alterações morfológicas do sistema urogenital em ratos orquiectomizados e respostas com testosterona**", sob a responsabilidade de **Alexandre de Freitas Miranda**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA) em **04/06/2008**. Este certificado expira em **04/06/2010**.

Rio de Janeiro, 04 de Junho de 2008.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antonio Carlos da Silva', is written above a horizontal line.

Prof. Antonio Carlos da Silva  
Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ