



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Alessandro de Sousa Mendes de Sena

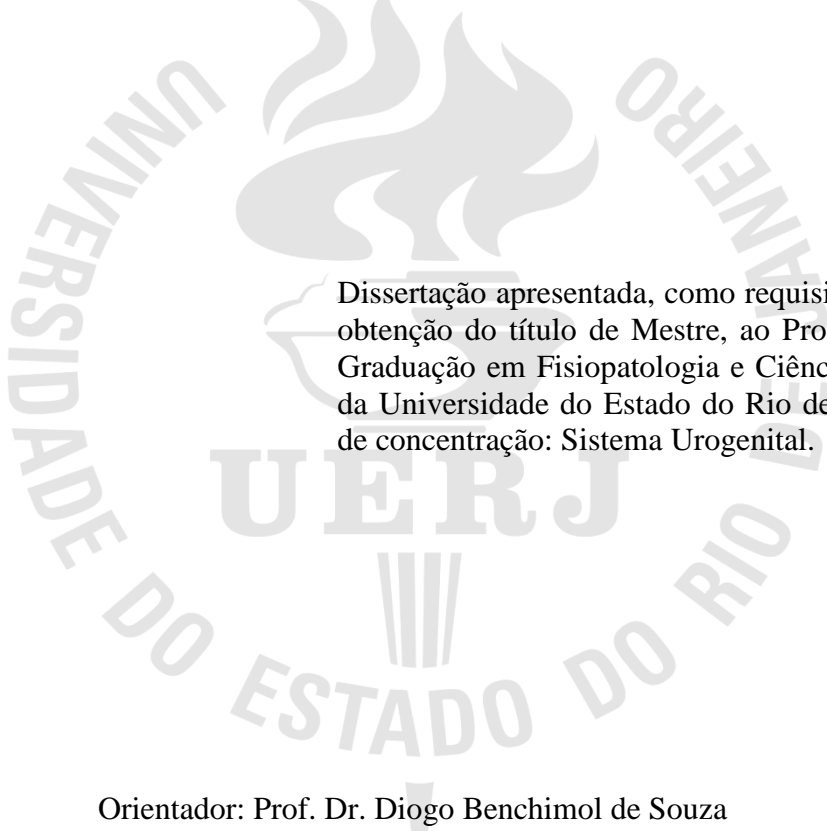
**Análise do pênis de rato após administração crônica de esteróide
anabólico androgênico**

Rio de Janeiro

2015

Alessandro de Sousa Mendes de Sena

Análise do pênis de rato após administração crônica de esteróide anabólico androgênico



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

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Rio de Janeiro

2015

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

S474 Sena, Alessandro de Sousa Mendes de.
Análise do pênis de rato após administração crônica de esteróide anabólico androgênico / Alessandro de Sousa Mendes de Sena. – 2015.
47 f.

Orientador: Diogo Benchimol de Souza.

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

1. Pênis – Anatomia - Teses. 2. Rato como animal de laboratório– Morfologia – Teses. 3. Esteróides anabólicos – Teses. 4. Impotência sexual - Teses. I. Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 591.464.1:599.323.41

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

Assinatura

Data

Alessandro de Sousa Mendes de Sena

Análise do pênis de rato após administração crônica de esteróide anabólico androgênico

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

Aprovada em 27 de maio de 2015.

Orientador:

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

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Carla Braga Mano Gallo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Bianca Martins Gregório
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Alexandre de Freitas Miranda
Hospital de Ipanema

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Benchimol de Souza por ter me aceitado como orientando, pelo interesse, pelos ensinamentos e atenção despendidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Rafael Áreas, por sua ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

A Prof.^a Dra. Bianca Gregório, aos pós-graduandos Suellen Costa, Jorge Medeiros, Michele Simões pelas elucidações que contribuíram muito para esse trabalho, às estagiárias Edilaine e Fabiana e a técnica Priscila que de tiveram grande parcela de contribuição.

Ao Prof. Dr. Francisco Sampaio, coordenador deste programa de pós-graduação, por prezar pela qualidade do serviço, me possibilitando participar de um excelente curso.

RESUMO

SENA, Alessandro de Sousa Mendes. *Análise do pênis de rato após administração crônica de esteróide anabólico androgênico*. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Esteróides Anabolizantes Androgênicos (EAA) têm sido usados por atletas com o objetivo de melhorar a massa muscular. O abuso de EAA está associado com distúrbios urogenitais, inclusive com disfunção erétil. Contudo as alterações morfológicas penianas decorrentes do uso de EAA não foram descritas. O objetivo é avaliar as alterações morfológicas do pênis de ratos púberes e adultos tratados cronicamente com doses supra-fisiológicas de EAA. No trabalho foram usados quarenta e oito ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos: ratos controle, com 105 dias (C105) e com 65 dias de idade (C65) submetidos a injeção de veículo e ratos tratados, com 105 dias (T105) e com 65 dias de idade (T65), submetidos à injeção de decanoato de nandrolona na dose de 10 mg/Kg, uma vez por semana, durante oito semanas. Os ratos foram mortos, seus pênis foram coletados, fixados e processados de maneira rotineira para histologia. Cortes de 5µm de espessura foram corados com Tricrômico de Masson, Vermelho de Picrosirius e analisados em microscopia de luz. As densidades de superfície do espaço sinusoidal, músculo liso e tecido conjuntivo do corpo cavernoso foram calculadas pelo método de contagem de pontos. A área do pênis, do corpo cavernoso (com e sem túnica albugínea) e da túnica albugínea foram medidos em cortes transversais. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste t de Student. Em todos os casos, a significância foi fixada em um valor de probabilidade de 0,05. Nos resultados entre outras diferenças, destaca-se uma diminuição do corpo cavernoso sem túnica albugínea de 12,5% no grupo T105 e de 10,9% no grupo T65, em comparação com os seus controles. A densidade de superfície de músculo liso cavernoso apresentou uma diminuição de 5,6% e 12,9% nos grupos T65 e T105, comparando-se com os seus controles. O espaço sinusoidal aumentou em 17% no grupo T105 e diminuiu em 9,6% no grupo T65. Concluímos que o uso de altas doses de EAA promoveu mudanças estruturais no pênis dos ratos adultos, e estas podem estar envolvidas na disfunção erétil.

Palavras-chave: Pênis. Rato. Esteróide anabolizante. Disfunção erétil.

ABSTRACT

SENA, Alessandro de Sousa Mendes. *Morphometric study of the rat penis after chronic administration anabolic androgenic steroid*. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Anabolic androgenic steroids (AAS) are used by many athletes to improve muscle mass. AAS abuse is associated with urogenital disorders, including erectile dysfunction. However, penile morphological changes resulting from the use of AAS have not been described. The aim of the study is to assess the penile morphological modifications of pubertal and adult rats chronically treated with supra-physiological doses of AAS. Forty-eight male Wistar rats were divided into four groups: control rats, 105 days (C105) and 65 days old (C65), subjected to injection of the vehicle only; and treated mice, 105 days (T105) and 65 days old (T65), subjected to injection of nandrolone decanoate at a dose of 10 mg/kg once a week for eight weeks. The rats were killed and their penises were collected, fixed and processed routinely for histology. Sections 5µm thick were stained with Masson trichrome, picrosirius red and examined under light microscopy. The surface density of the sinusoidal space and smooth muscle of the corpus cavernosum tissue were calculated by the point counting method. The area of the penis, the corpus cavernosum (with and without tunica albuginea) and tunica albuginea were measured in transverse sections. The group means were compared using the Student t-test. In all cases, significance was set at 0.05 probability. Among other differences, there was a decrease in the corpus cavernosum without tunica albuginea of 12.5% in the T105 group and 10.9% in the T65 group, compared to their controls. The cavernous smooth muscle surface density decreased 5.6% and 12.9% in T65 and T105 groups compared with their controls. The sinusoidal space increased by 17% in the T105 group and decreased by 9.6% in the T65 group. The use of high doses of ASA promoted structural changes in the adult rat penis, and these may be involved in erectile dysfunction.

Keywords: Penis. Anabolic agents. Rat. Erectile dysfunction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Pênis de rato, vista lateral.....	16
Figura 2 –	Recurso <i>cell conter</i> para quantificação no software Image J.....	18
Figura 3 –	Fotomicrografia, do pênis de rato, corado com vermelho de picrosirius aumento de 12x.....	20
Figura 4 –	Calibração da régua milimetrada no <i>imageJ</i> , aumento de 12x.....	20
Figura 5 –	Mensurando a área total do corte transversal do terço médio do pênis, aumento 12x.....	21
Figura 6 –	Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso com a túnica albugínea, aumento 12x.....	22
Figura 7 –	Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso sem a túnica albugínea, aumento 12x.....	22
Tabela 1–	Dados morfométricos do pênis de animais púberes.....	25
Tabela 2–	Morfometria peniana de animais adultos.....	25
Figura 8 –	Fotomicrografia de corpo cavernoso do pênis de rato	26
Figura 9 –	Densidade de superfície do espaço sinusoidal do corpo cavernoso dos animais.....	27
Figura 10–	Densidade de superfície do músculo liso do corpo cavernoso dos animais..	27
Figura 11–	Densidade de superfície do tecido conjuntivo do corpo cavernoso dos animais.....	28
Figura 12–	Fotomicrografia do corte transversal do pênis de ratos	29
Figura 13–	Área total do pênis dos ratos.....	30
Figura 14–	Área do corpo cavernoso do pênis com túnica albugínea.....	30
Figura 15–	Área do corpo cavernoso do pênis sem túnica albugínea.....	31
Figura 16–	Fotomicrografia do corpo cavernoso do pênis de ratos.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C65	Grupo de ratos controle com 65 dias de idade
C105	Grupo de ratos controle com 105 dias de idade
C. C.	Corpo cavernoso
SNC	Sistema Nervoso Central
c /ta	Com túnica albugínea
DE	Disfunção erétil
EAA	Esteróide anabólico androgênico
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropinas
LH	Hormônio luteinizante
s /ta	Sem túnica albugínea
T65	Grupo de ratos tratados com 65 dias de idade
T105	Grupo de ratos tratados com 105 dias de idade

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro quadrado
n	Número
%	Porcentagem
C	Celcius

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVO	14
2	MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1	Animais	15
2.2	Grupos	15
2.3	Eutanásia dos animais e coleta dos tecidos	16
2.4	Microscopia de Luz	17
2.4.1	<u>Densidade de superfície</u>	17
2.4.2	<u>Área do corte transversal do pênis, área do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea e área da túnica albugínea</u>	19
2.4.2.1	Calibração do <i>software image J</i>	19
2.4.3	<u>Tipos de colágeno</u>	23
2.5	Análise Estatística	23
3	RESULTADOS	24
4	DISCUSSÃO	33
	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICE - Artigo científico referente à dissertação.....	41
	ANEXO –Parecer do Comitê de Ética sobre o estudo.....	47

INTRODUÇÃO

Os testículos secretam vários hormônios sexuais masculinos, que são coletivamente denominados androgênios. Entretanto, um deles, a testosterona, é tão mais abundante e potente que os outros, que pode ser considerado como sendo o principal hormônio masculino, responsável pelos efeitos característicos do gênero (GUYTON & HALL, 1997).

Assim como a testosterona endógena, os EAA podem exercer grandes efeitos sobre o corpo humano, diminuindo o teor de gordura corporal e aumentando a massa muscular, com consequente melhora do desempenho atlético. A partir da produção de EAA em laboratório, aumentaram os estudos sobre os hormônios e sua ação terapêutica. Por isso a administração indiscriminada tem aumentado de forma significativa (YESALIS et al., 1993). Fisiculturistas, atletas amadores e de recreação utilizam essas drogas para fins estéticos e com intuito de melhorar o desempenho esportivo (FORTUNATO et al., 2006).

Foi mostrado que cerca de 1 a 3 milhões de homens e mulheres nos Estados Unidos fazem uso dos EAA (BAHRKE et al., 2000). Segundo alguns autores, a utilização destas drogas comumente é feita em doses 10 a 100 vezes acima da fisiológica, por administração de um tipo único ou uma mistura de vários EAA (BRONSON, 1997; CLARK et al., 1997; FEINBERG et al., 1997; HARTGENS & KUIPERS, 2004.; POPE & KATZ, 1994).

Os EAA exógenos administrados irão suprimir as produções de GnRH pelo hipotálamo e produção do hormônio luteinizante pela glândula hipófise e posteriormente suprimir a produção de testosterona testicular (DOHLE et al., 2003). O mecanismo de ação dos EAA podem diferir entre os compostos, devido às variações na molécula do esteróide e afinidade para receptores de andrógenos (HARTGENS & KUIPERS, 2004). Os autores PITTELOUD (2008) e HAYES (2001) também citam que os esteróides promovem um feedback negativo sobre o hipotálamo.

Muitos efeitos colaterais em órgãos andrógeno-dependentes foram descritos e isso depende da dose e do tempo de administração (SHAHIDI, 2001), alguns relatados incluem acne, atrofia testicular, ginecomastia, hipertensão, arritmia, infarto do miocárdio, depressão, aumento da quantidade de hemácias, alteração da função diastólica, diminuição na contagem de espermatozóides e mortalidade (DICKERMAN et al., 1997; FARRELL & MCGINNIS, 2004).

Outros efeitos colaterais têm sido relacionados ao uso de EAA, incluindo desordens do sistema urogenital (LUCÍA et al., 1996). Sabe-se que altas doses de decanoato de nandrolona

reduz o volume testicular e o comprimento dos túbulos seminíferos em ratos (SHOKRI et al., 2010). Na próstata, foi visto uma diminuição do peso e volume prostático, mas com aumento da altura do epitélio prostático em ratos que usaram EAA (VARGAS et al., 2013). Um estudo mostrou que altas doses de EAA encurtou a vida de ratos machos. Neste trabalho 52% dos ratos tratados morreram em um ano de tratamento, enquanto a mortalidade foi de 12% no grupo controle (BRONSON, 1997).

A disfunção erétil (DE), também conhecida como impotência sexual masculina, é definida como a incapacidade persistente (por no mínimo 6 meses) de obter e manter uma ereção firme o suficiente para permitir uma performance sexual satisfatória (ALBERSEN, 2011).

Estudos em animais e humanos têm sugerido que os níveis adequados de hormônios androgênicos são necessários para preservar a morfologia do tecido erétil peniano, sendo importante também para o mecanismo bioquímico envolvido na ereção. Um baixo nível de testosterona pode estar associado à disfunção erétil (MILLS et al., 1996; GRANATA et al., 1997; DAI et al., 1999; SHEN et al., 2003; GOOREN e SAAD, 2006; TRAISH e GUAY, 2006; DE SOUZA et al., 2012). Dessa forma a relação entre os hormônios androgênicos e o funcionamento normal do pênis como órgão sexual é bastante conhecida.

Os EAA diminuem os níveis de testosterona endógena e de hormônios gonadotróficos, reduzindo também o peso testicular, contagem de espermatozóides e a motilidade dos espermatozóides (SHAHIDI, 2001). Os androgênios exercem seus efeitos biológicos através de um único receptor intracelular que está presente no trato reprodutivo, bem como, em muitos tecidos não-reprodutivos como osso, músculo esquelético, cérebro, fígado, rim e adipócitos. Os EAA se ligam ao mesmo receptor que a testosterona e a dihidrotestosterona, porém os efeitos vistos são algumas vezes distintos (SHAHIDI, 2001).

Um dos EAA mais usados e aprovados pelo órgão americano controlador de alimentos e remédios é o decanoato de nandrolona (Deca Durabolin®)(SHAHIDI, 2001). Por este motivo, no presente estudo foi usado especificamente o decanoato de nandrolona.

Em 1950 a nandrolona foi sintetizada (BIRCH, 1950). Este andrógeno é metabolizado de maneira similar à testosterona e seus principais subprodutos são a 3-norandrosterona (um derivado 5α) e a 2-noreticolanolona (um derivado 5β) (ENGEL et al., 1958). Foi mostrado que a nandrolona, assim como a testosterona, pode sofrer aromatização (Gaillard & Silberzahn, 1987). Mesmo tendo similaridade com a testosterona, a nandrolona tem maior efeito anabólico. A substituição de um átomo de hidrogênio no grupo metil C19 da testosterona cria um novo centro

assimétrico em C10, que pode ser responsável por favorecer a relação anabólico-androgênica da droga (SHAHIDI, 2001).

No trabalho usamos o pênis de ratos como modelo de estudo, assim, é interessante que a anatomia peniana desses animais seja brevemente descrita. O tecido erétil peniano dos ratos é composto por um par de corpos cavernosos, unidos entre si e situados dorsalmente ao corpo esponjoso, além de fâscias, nervos e vasos, todos recobertos pela pele. A maior parte do pênis é formada pelos corpos cavernosos, os quais se originam sob sínfise púbica correndo lado a lado. Ventralmente aos corpos cavernosos localiza-se o corpo esponjoso, que abriga no seu interior a uretra. Estas estruturas são envolvidas por uma camada de tecido fibroso, a túnica albugínea, que varia em espessura tornando-se mais delgada ao envolver o corpo esponjoso. Próximo ao seu terço distal, a haste peniana tem uma flexura em ângulo reto. Apresenta pouco tecido erétil e uma estrutura óssea localizado mais distalmente (QUINLAN et al., 1989).

Os corpos cavernosos são formados por uma camada de células musculares lisas localizadas na região subendotelial que circunda os espaços vasculares (sinusóides), situados entre as trabéculas. Estes feixes musculares têm disposição longitudinal e transversal. As fibras musculares lisas dos corpos cavernosos são os elementos que se encontram em menor número entre os componentes do corpo cavernoso do pênis (PINHEIRO et al., 2000).

Sabe-se que níveis adequados de testosterona são necessários para a manutenção da morfologia peniana normal nesta espécie (DE SOUZA et al., 2012; MIRANDA et al., 2012). Contudo, até o momento, não há informações sobre os efeitos de doses supra-fisiológicas de decanoato de nandrolona no tecido do corpo cavernoso. Tem sido visto que o uso de altas doses deste EAA causa efeitos adversos sobre diferentes órgãos (VARGAS et al., 2013; FORTUNATO et al., 2006; FRANKENFELD et al., 2014), contudo os efeitos deste fármaco sobre na estrutura do pênis tem recebido menos atenção.

1 OBJETIVO

Estudar os efeitos de doses supra-fisiológicas de esteróides anabólicos androgênicos na morfologia peniana de ratos púberes e adultos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA). Número de aprovação 050/2012.

2.1 Animais

Quarenta e oito ratos Wistar machos foram mantidos em biotério com iluminação artificial controlada (12h ciclo claro-escuro), temperatura (21 ± 2 ° C) e oferecido ração comercial e água *ad libitum*. O estudo teve início com vinte animais, foi realizado no Laboratório de Biologia do Exercício e Laboratório de Fisiologia Endócrina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em conjunto com a Unidade de Pesquisa Urogenital da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), onde o número de animais foi aumentado em mais vinte e oito. Metade dos animais recebeu uma injeção de EAA e a outra metade recebeu injeção de um veículo, passando pelo mesmo estresse do gupo tratado. Posteriormente os animais foram submetidos a eutanásia, onde o pênis, próstata e testículos foram coletados, em conformidade com as orientações convencionais para a experimentação com animais.

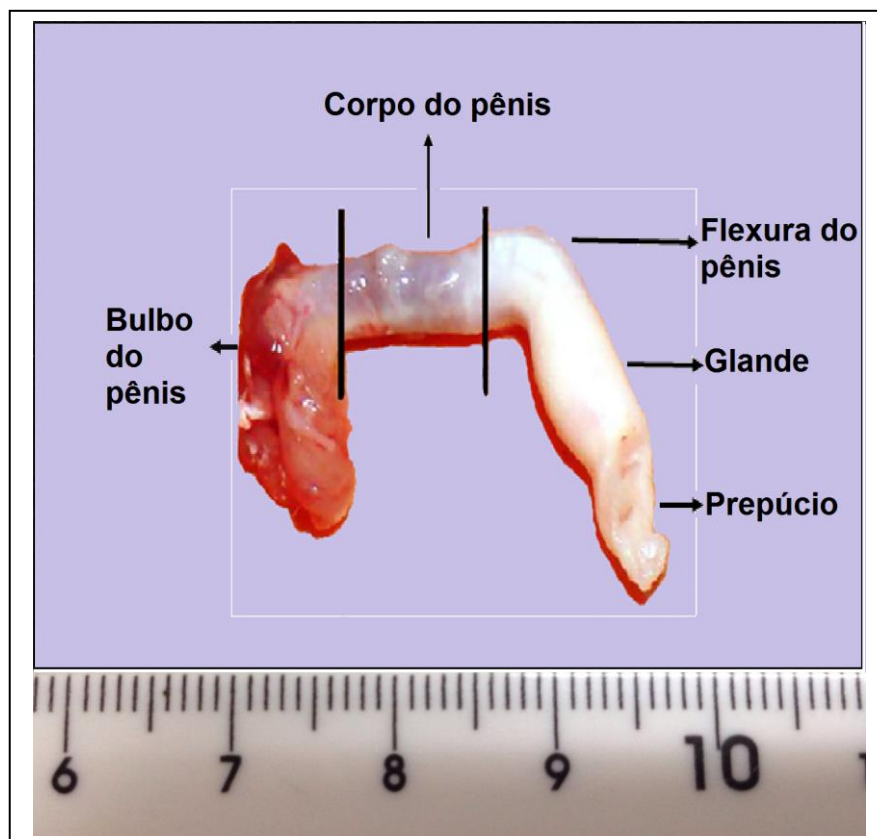
2.2 Grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos: ratos controle adultos, com 105 dias de idade (C105) (n =10) e púberes, com 65 dias de idade (C65) (n = 14), submetidos à injeção de veículo (óleo de amendoim com 10% álcool benzóico) e ratos adultos, com 105 (T105) (n=10) e púberes, com 65 dias de idade (T65) (n=14), tratados com decanoato de nandrolona (Deca Durabolin 50 mg.mL⁻¹ Organon) 10 mg/Kg de peso corporal. Esteróide e veículo foram administrados por injeção intramuscular no membro posterior uma vez por semana por oito semanas, sempre às nove horas da manhã (FORTUNATO et al., 2006; VARGAS et al. 2013).

2.3 Eutanásia dos animais e coleta dos tecidos

Após as oito semanas de tratamento, com 161 dias de idade (C105 e T105) e com 121 dias de idade (C65 e C105), os ratos foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica (100 mg/Kg tiopental sódico, injetado por via intraperitoneal) (Cristália, São Paulo, Brasil). Foi feita a retirada do pênis e o seu terço médio foi fixado em formaldeído 4% para posterior análise histológica.

Figura 1- Fotografia pênis de rato em vista lateral



Fonte: O Autor, 2015.

2.4 Microscopia de Luz

As amostras do terço médio do pênis dos animais fixados em formaldeído 4%, foram submetidas às técnicas histológicas de rotina, desidratadas em álcool, clarificadas em xilol para posterior inclusão em parafina e cortado em 5 μm de espessura por micrótomo (CUT 4060, Olympus, Tóquio, Japão). Corados pela hematoxilina & eosina para verificar a integridade dos tecidos, pelo tricrômico de Masson para avaliar a densidades das estruturas eréteis do pênis e pelo vermelho de picrosirius para analisar a área de secção transversa das estruturas do pênis e para análise subjetiva dos tipos de colágeno, quando observado sob a luz polarizada. As imagens de microscopia de luz convencional e polarizada foram capturadas por uma câmera DP70 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio BX51 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.4.1 Densidades de superfície

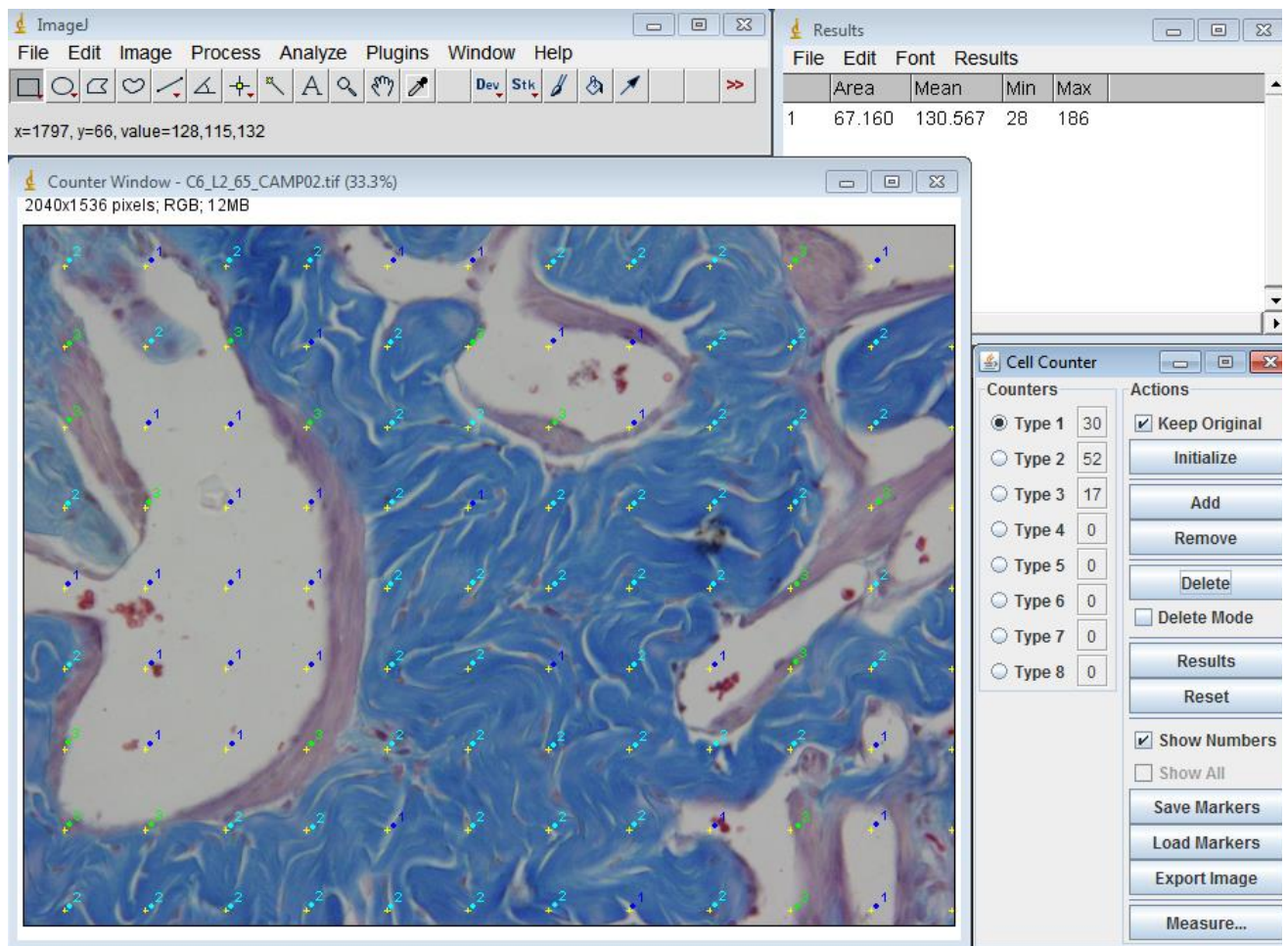
As densidades de superfície do espaço sinusoidal, do tecido conjuntivo e do músculo liso dos corpos cavernosos foram quantificadas por análise dos cortes corados com tricrômico de Masson. Para cada animal foram obtidas 25 fotomicrografias do corpo cavernoso com magnificação de 400x, a densidade de cada uma dessas estruturas foi expressa em porcentagem, obtida pelo método de contagem de pontos.

A contagem usa uma grade de 99 pontos para obter a densidade de superfície das estruturas de interesse, sobrepondo às imagens usando a ferramenta *grid* do *software Image J* (versão 1.45s, Instituto Nacional de Saúde, EUA). A fotomicrografia do corpo cavernoso é sobreposta por 99 cruces, onde o quadrante superior direito das cruces são os locais de identificação das estruturas quantificadas. Sendo posteriormente multiplicado por 100 e dividido por 99 a fim de corrigir a porcentagem para os 99 pontos utilizados como sistema de teste. Desta forma, estes resultados são considerados como a densidade de superfície de cada uma das estruturas analisadas, expressas em porcentagem.

A ferramenta *cell counter* possibilita quantificar mais de uma estrutura na mesma imagem. Após selecionar o número e realizar as quantificações, as quantidades de seleções em cada estrutura ficarão registradas na janela *cell counter* ao lado do seu número. Os valores

encontrados, de cada estrutura em cada imagem, foram tabulados e as médias de cada animal utilizadas para análise estatística. A Figura 3 mostra a grade de 99 pontos e a contagem no *Image J*. (DE SOUZA, 2012).

Figura 2 – Recurso *cell conter* para quantificação no software *Image J*



Legenda: Imagem do corpo cavernoso do pênis de rato corado com de tricrômico de Masson e aumento de 400x, utilizando o recurso *Cell Conter* onde tipo 1 corresponde à contagem do espaço sinusóide, tipo 2 ao tecido conjuntivo e tipo 3 ao músculo liso

Fonte: O Autor, 2015.

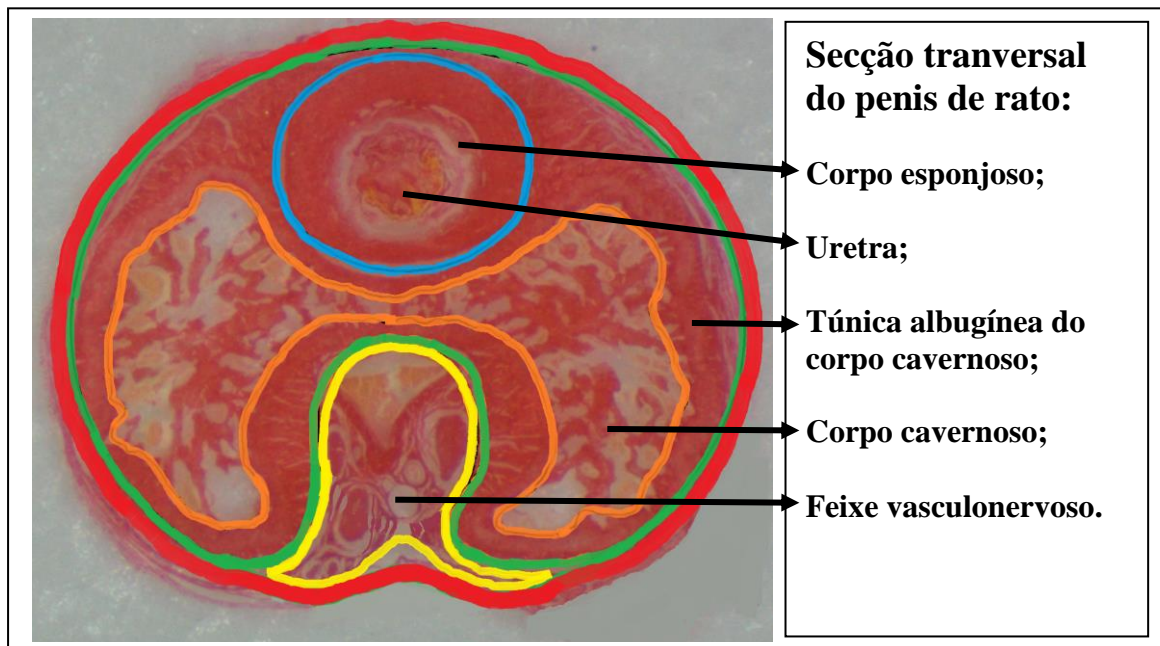
2.4.2 Área do corte transversal do pênis, área do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea e área da túnica albugínea

Nas análises das áreas do pênis foram utilizadas fotomicrografias de lâminas coradas pelo vermelho de picrossírius (Figura. 4), capturadas em fundo claro, com aumento de 12x por uma câmera digital (AxionCan ERC5S, Karl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada ao microscópio estereoscópico (SteREO Discovery V8, Karl Zeiss, Gottingen, Alemanha). Em uma única imagem é possível observar todo o corte transversal do pênis, onde o estudo especificou as áreas do corte transversal do pênis, do corpo cavernoso com e sem sua túnica albugínea, mensuradas em mm^2 . Estas mensurações foram realizadas no *software Image J* com a ferramenta “*free Hand*”. Na apresentação dos dados em mm^2 foi necessário realizar, previamente a mensuração e calibração do software com a fotomicrografia da lâmina histológica junto a uma régua milimetrada (FELIX-PATRÍCIO, 2015).

2.4.2.1 Calibração do *software image J* (versão 1.45s)

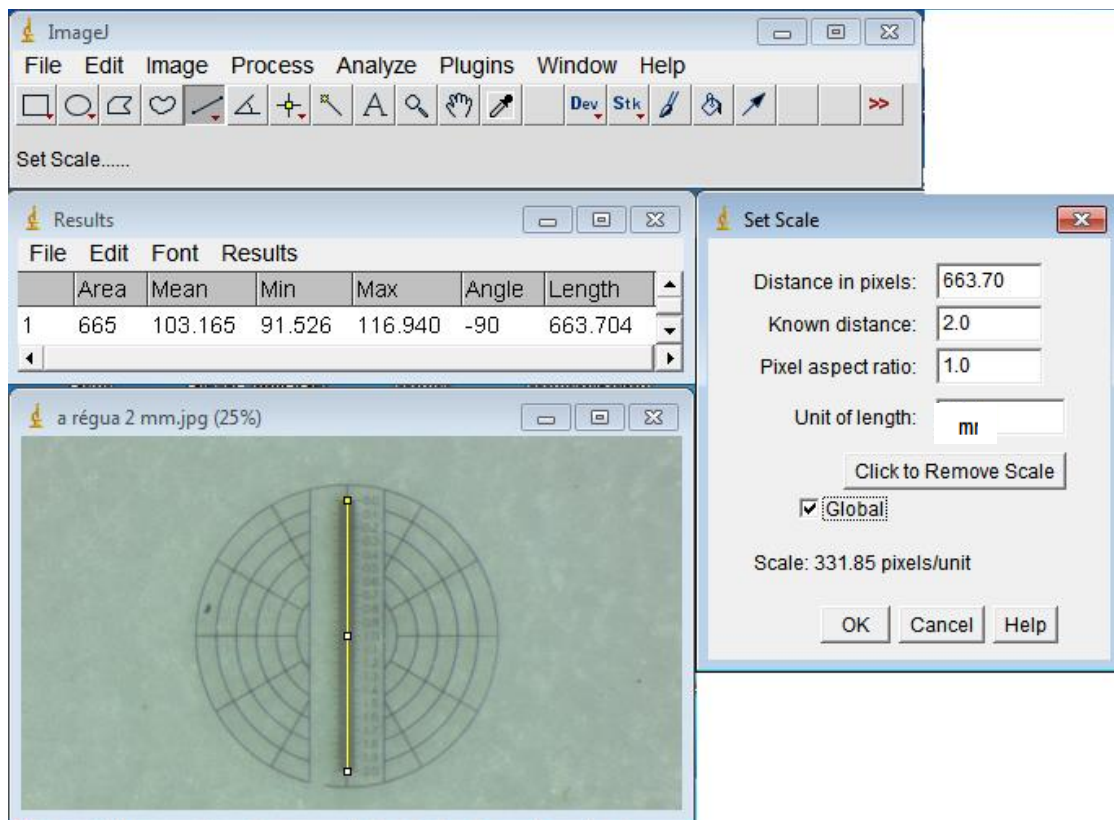
Para obtenção dos dados em mm^2 é necessário calibrar o software, pois a unidade em que qualquer software de imagem se baseia é o pixel. O software nos fornece a distância em pixels, e informamos ao software que aquela distância (comprimento) corresponde 2,0 mm. Ao marcarmos a opção do *box global*, qualquer mensuração realizada no software, enquanto estiver aberto, estará em mm. Para certificarmos nossa calibração, mensuramos novamente a distância marcada, e o resultado deverá ser 2,0 mm (Figura. 5) (FELIX-PATRÍCIO, 2015).

Figura 3 - Fotomicrografia do terço médio do pênis de rato, corado com vermelho de picrosirius com aumento de 12x



Fonte: O Autor, 2015.

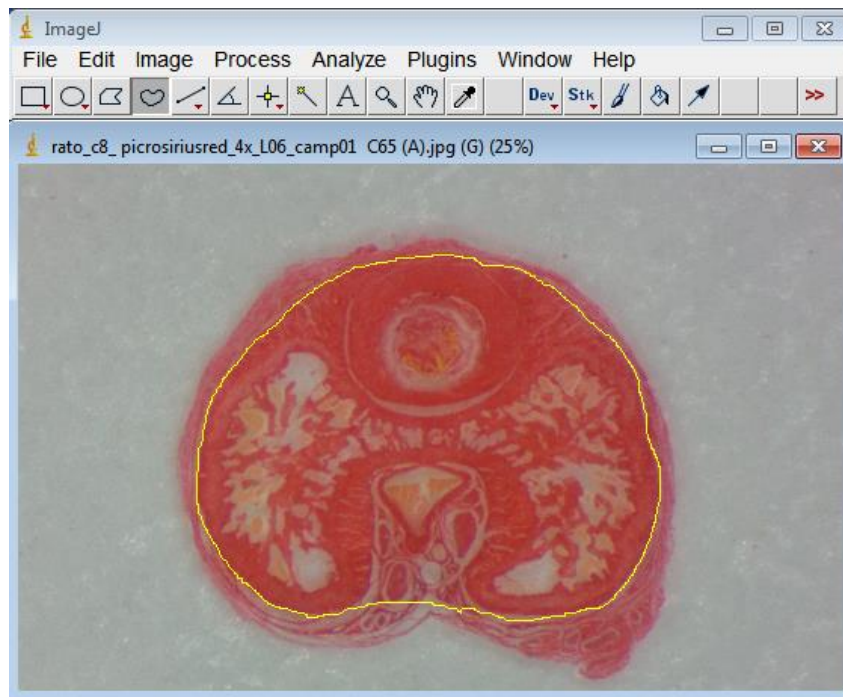
Figura 4 - Calibração da régua milimetrada no *imageJ*, aumento de 12x



Fonte: O Autor, 2015.

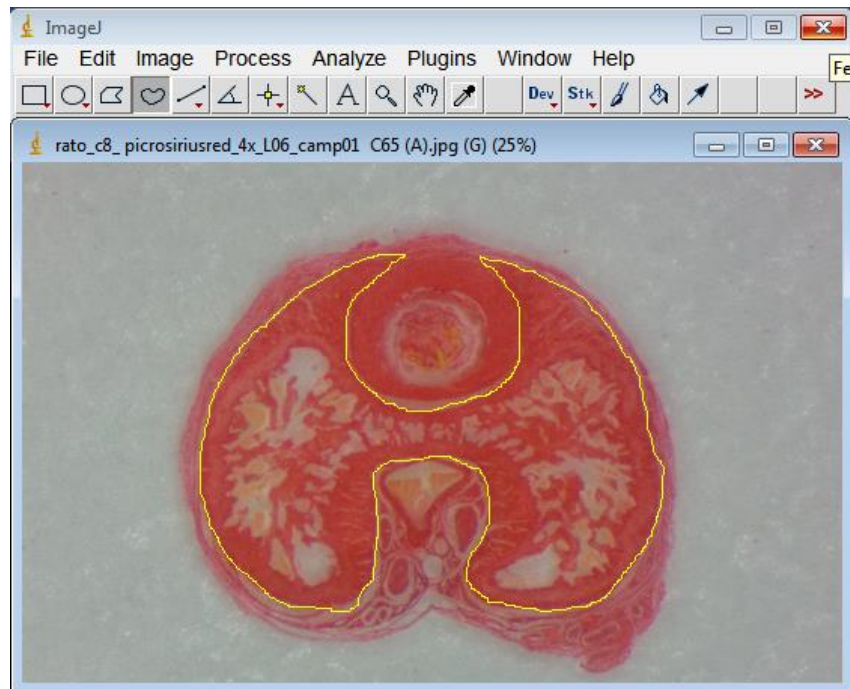
Em seguida foram mensuradas a área total do pênis (Figura 6) e as áreas do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea (Figura 7 e 8). Depois de marcar a área desejada foram selecionadas as opções *analyze e measure*. A janela *results* apresenta os valores referentes às áreas envolvidas em mm^2 . O mesmo procedimento foi realizado para analisar todas as áreas dos cortes transversais, exceto a área do corte transversal da túnica albugínea do corpo cavernoso, que foi estimada pela subtração da área do corpo cavernoso com e sem sua túnica albugínea. Todos resultados foram tabulados em planilha para análise estatística (FELIX-PATRÍCIO, 2015).

Figura 5 – Mensurando a área total do corte transversal do terço médio do pênis, aumento 12x



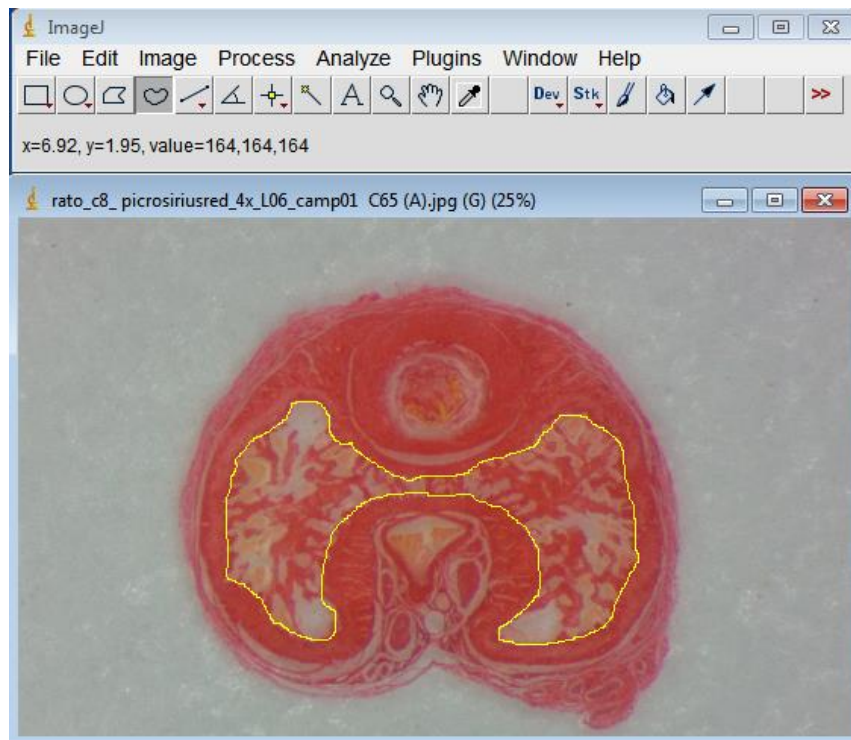
Fonte: O Autor, 2015.

Figura 6 – Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso com a túnica albugínea, aumento de 12x



Fonte: O Autor, 2015.

Figura 7 - Mensurando a área do corte transversal do terço médio do corpo cavernoso sem a túnica albugínea, aumento de 12x



Fonte: O Autor, 2015.

2.4.3 Tipos de Colágeno

O método de coloração pelo vermelho de Picro Sirius faz com que os radicais sulfônicos do corante reajam com os grupamentos amínicos da lisina, um dos principais aminoácidos que compõe o colágeno, tornando a birefringência mais intensa (MONTES e JUNQUEIRA, 1991). O colágeno apresenta-se birefrigente com diferentes tons entre verde e vermelho, quando observado sob luz polarizada em um fundo negro (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008)

Nestes mesmos cortes, sob magnificação de 400x e sob luz polarizada foi analisado subjetivamente a presença de diferentes tipos de colágeno no corpo carvernososo, tipo III (observado em verde) e tipo I (em vermelho/ laranja) (MONTES, 1996). Esta avaliação foi realizado em imagens capturadas com uma câmara digital (DP70, Olympus, Tóquio, Japão), acoplada a um microscópio (BX51 da Olympus, Tóquio, Japão).

2.5 **Análise Estatística**

Toda análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os dados foram tabulados e avaliados quanto à normalidade (distribuição Gaussiana) pelo teste de D'Agostino e Pearson. Os dados que obedeceram a distribuição Gaussiana foram comparados pelo teste t de Student considerando $p < 0,05$ como significativo. Já para os dados que não estavam dentro da curva de normalidade foi utilizado o teste de Mann-Whitney, também considerando $p < 0,05$ como significativo.

3 RESULTADOS

A densidade de superfície do espaço sinusoidal diminuiu em 10% no grupo T65 comparado com o grupo C65. Na densidade de superfície do músculo liso o tratamento promoveu uma redução de 6% no grupo T65 comparado com o grupo C65. No grupo T65 uso da nandrolona acarretou um aumento de 7% na densidade de superfície do tecido conjuntivo quando comparado com o C65 (Tabela 1, Figuras 9, 10, 11 e 12).

Já no grupo T105 a densidade de superfície do espaço sinusoidal aumentou em 17% quando comparado ao grupo C105. Quanto à densidade do músculo liso o tratamento promoveu uma redução de 13% no grupo T105 comparando com o grupo C105. Na densidade do tecido conjuntivo o uso da nandrolona não acarretou diferença entre os grupos T105 e o grupo C105 (Tabela 2, Figuras 9, 10, 11 e 12).

Nos grupos T65 a área do pênis diminuiu em 6% comparando com o grupo C65. A área do corpo cavernoso incluindo e excluindo a túnica albugínea também apresentaram diminuição no grupo T65 comparado com o grupo C65 de 7 e 11%, respectivamente (Tabela 1, Figuras 13,14,15 e 16).

Nos animais do grupo T105, tanto a área do pênis quanto a área do corpo cavernoso incluindo a túnica albugínea não apresentaram alterações quando comparado ao grupo C105. Porém nas análises da área do corpo cavernoso excluindo a túnica albugínea, o uso da nandrolona acarretou uma redução de 13% no grupos T105 comparando como o grupo C105 (Tabela 2, Figuras 13,14,15 e 16).

Tabela 1 – Dados morfométricos do pênis de animais púberes

	C65	T65	P
Área da secção transversal do pênis (mm²)	7.48 ± 0.52	7.06 ± 0.66	<0.01
Área dos corpos cavernosos com túnica (mm²)	5.45 ± 0.39	5.07 ± 0.49	<0.01
Área dos corpos cavernosos sem túnica (mm²)	2.98 ± 0.39	2.65 ± 0.29	<0.001
Área da túnica albugínea (mm²)	2.47 ± 0.27	2.55 ± 0.48	0.70
Densidade de superfície do espaço sinusoidal (%)	28.7 ± 11.6	26.0 ± 10.2	<0.05
Densidade de superfície do tecido conjuntivo (%)	54.1 ± 13.4	57.8 ± 11.9	<0.01
Densidade de superfície do músculo liso (%)	16.0 ± 05.4	15.1 ± 5.0	<0.05

Legenda: Controle (C65) e animais submetidos ao tratamento com doses supra-fisiológica de esteróides anabólicos androgênicos (T65)

Nota: Os dados são apresentados como média±desvio padrão.

Fonte: O Autor, 2015.

Tabela 2 –Morfometria peniana de animais adultos

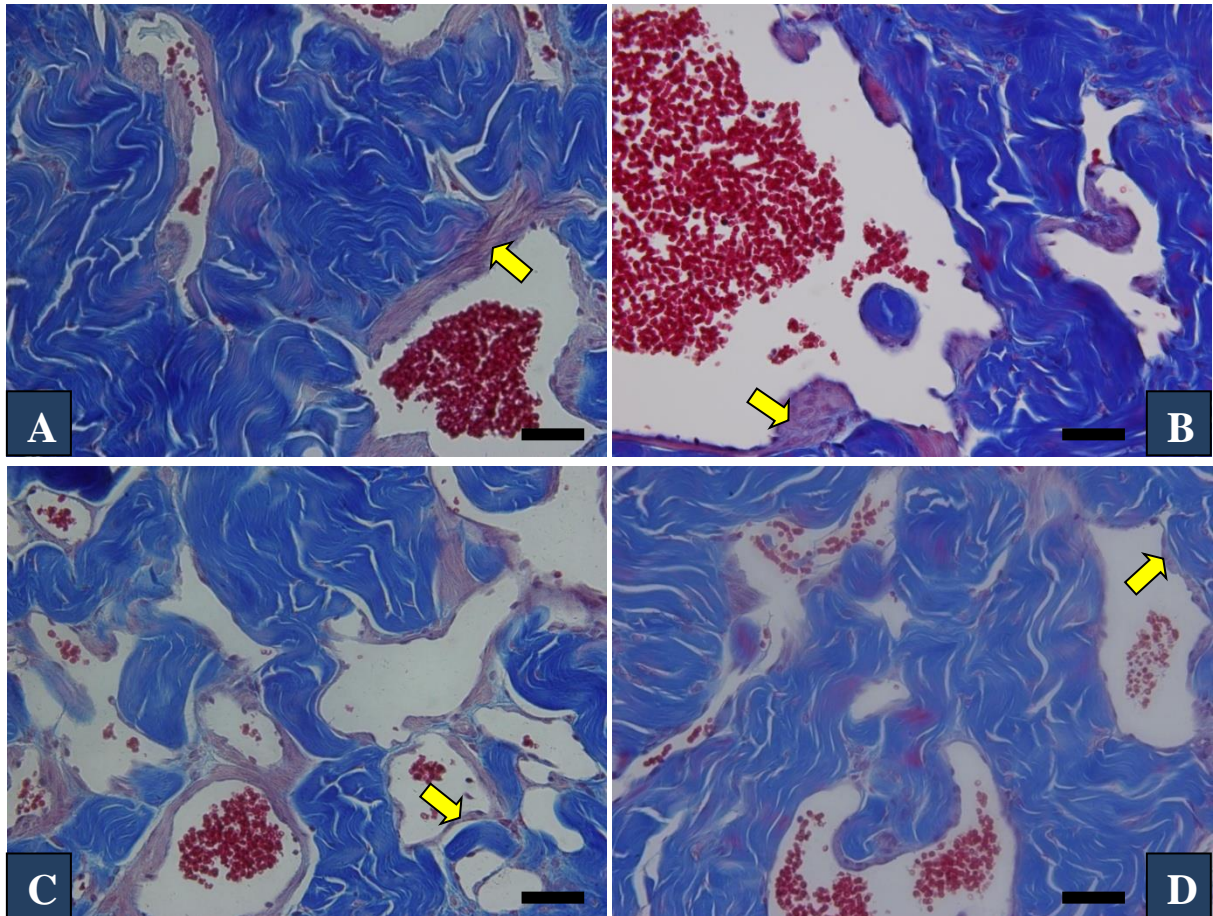
	C105	T105	P
Área da secção transversal do pênis (mm²)	7.22 ± 0.92	7.35 ± 1.16	0.57
Área dos corpos cavernosos com túnica (mm²)	5.32 ± 0.71	5.43 ± 1.03	0.66
Área dos corpos cavernosos sem túnica (mm²)	2.92 ± 0.34	2.55 ± 0.40	<0.01
Área da túnica albugínea (mm²)	2.40 ± 0.45	2.88 ± 0.70	<0.05
Densidade de superfície do espaço sinusoidal (%)	24.5 ± 8.2	28.7 ± 13.8	<0.05
Densidade de superfície do tecido conjuntivo (%)	59.5 ± 11.1	57.2 ± 15.5	0.40
Densidade de superfície do músculo liso (%)	15.1± 6.3	13.1 ± 4.6	<0.01

Legenda: Controle (C105) e submetidos ao tratamento com esteróide anabolizantes androgênicos (T105).

Nota: Os dados são apresentados como média±desvio padrão.

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 8 - Fotomicrografia de corpo cavernoso do pênis de rato

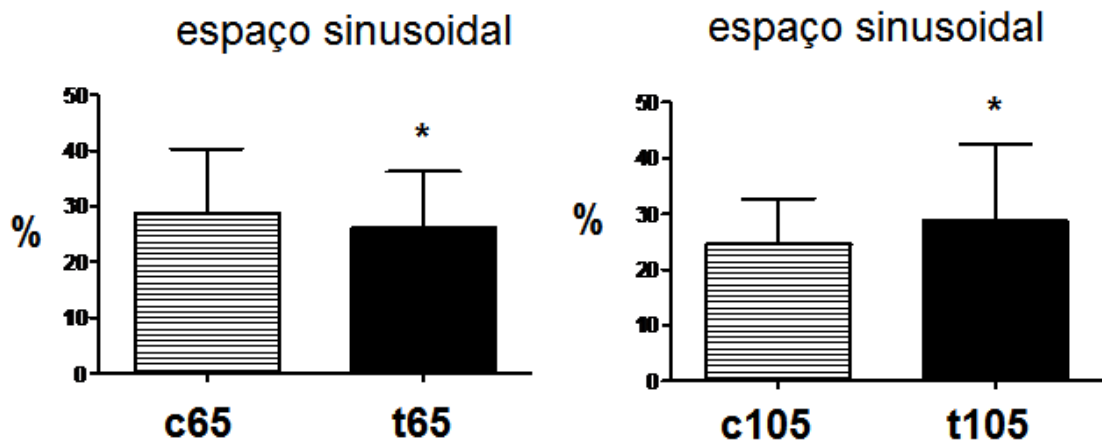


Legenda: Grupos C105 (A), T105 (B), C65 (C) e T65 (D). Tricrômico de Masson, Aumento de 400x

Nota: Na figura B o grupo T105 apresentou uma redução de 13% da musculatura lisa (seta amarela), um aumento de 17% do espaço sinusoidal (espaços brancos) e tecido conjuntivo (estrutura azul) não apresentou alterações estatísticas significativas, comparando com a figura A grupo C105. Já na figura D, grupo T65 apresentou uma redução de 6% da musculatura lisa (seta amarela), um aumento de 10% do espaço sinusoidal (espaços brancos) e tecido conjuntivo (estrutura azul) apresentou um aumento de 7% quando comparado com a figura C grupo C65. A barra de escala representa 200µm.

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 9 - Densidade de superfície do espaço sinusoidal do corpo cavernoso dos animais

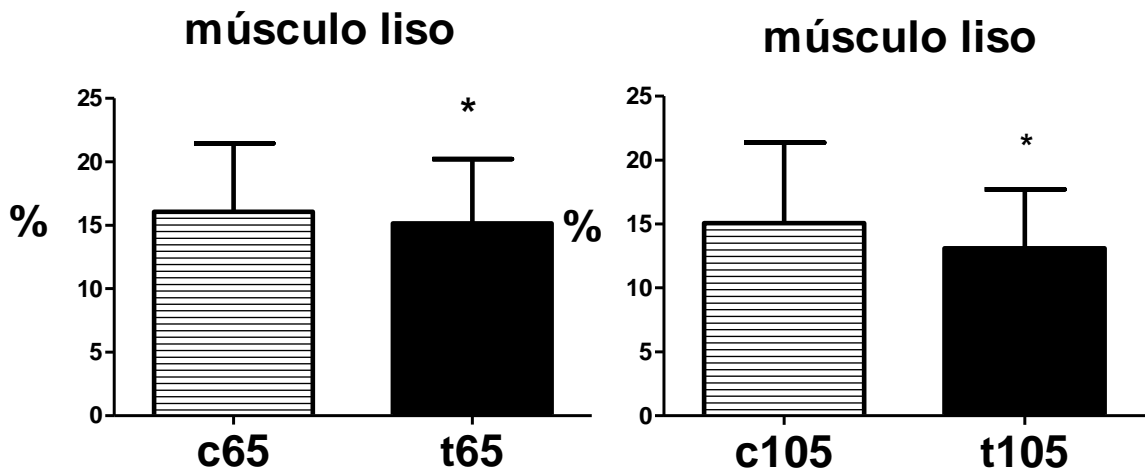


Legenda: Grupos C65 e T65 (gráfico à esquerda) e C105 e T105 (gráfico à direita). * $p < 0,05$

Nota: No gráfico à esquerda o grupo T65 apresentou uma redução de 10% comparada com o grupo C65, já o grupo T105 apresentou um aumento de 17% comparada com o grupo C105. O asterísco (*) indica diferença estatística ($p > 0,05$)

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 10 - Densidade de superfície do músculo liso do corpo cavernoso dos animais

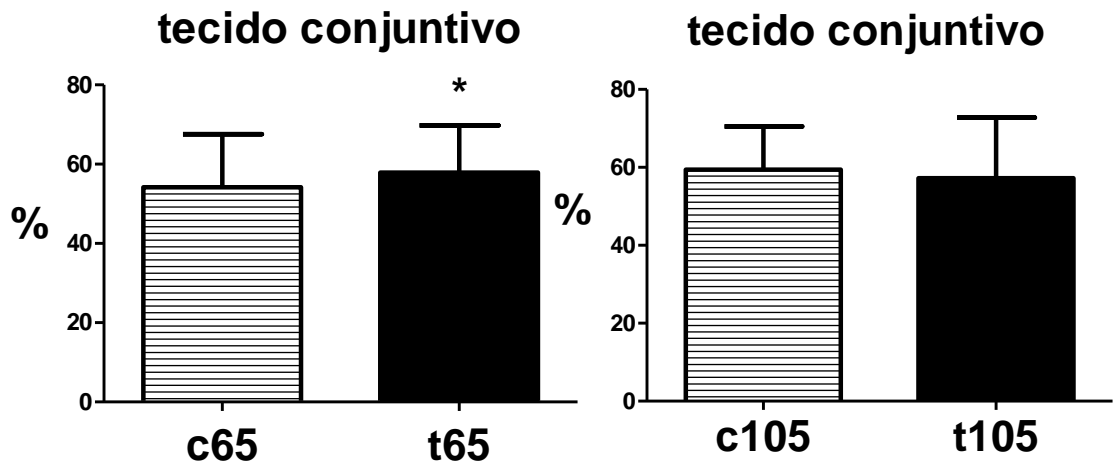


Legenda: Grupos C65 e T65 (gráfico à esquerda) e C105 e T105 (gráfico à direita). * $p < 0,05$

Nota: No gráfico à esquerda o grupo T65 apresentou uma redução de 6% comparada com o grupo C65, já o grupo T105 apresentou uma redução de 13% comparada com o grupo C105. O asterísco (*) indica diferença estatística ($p > 0,05$)

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 11 - Densidade de superfície do tecido conjuntivo do corpo cavernoso dos animais

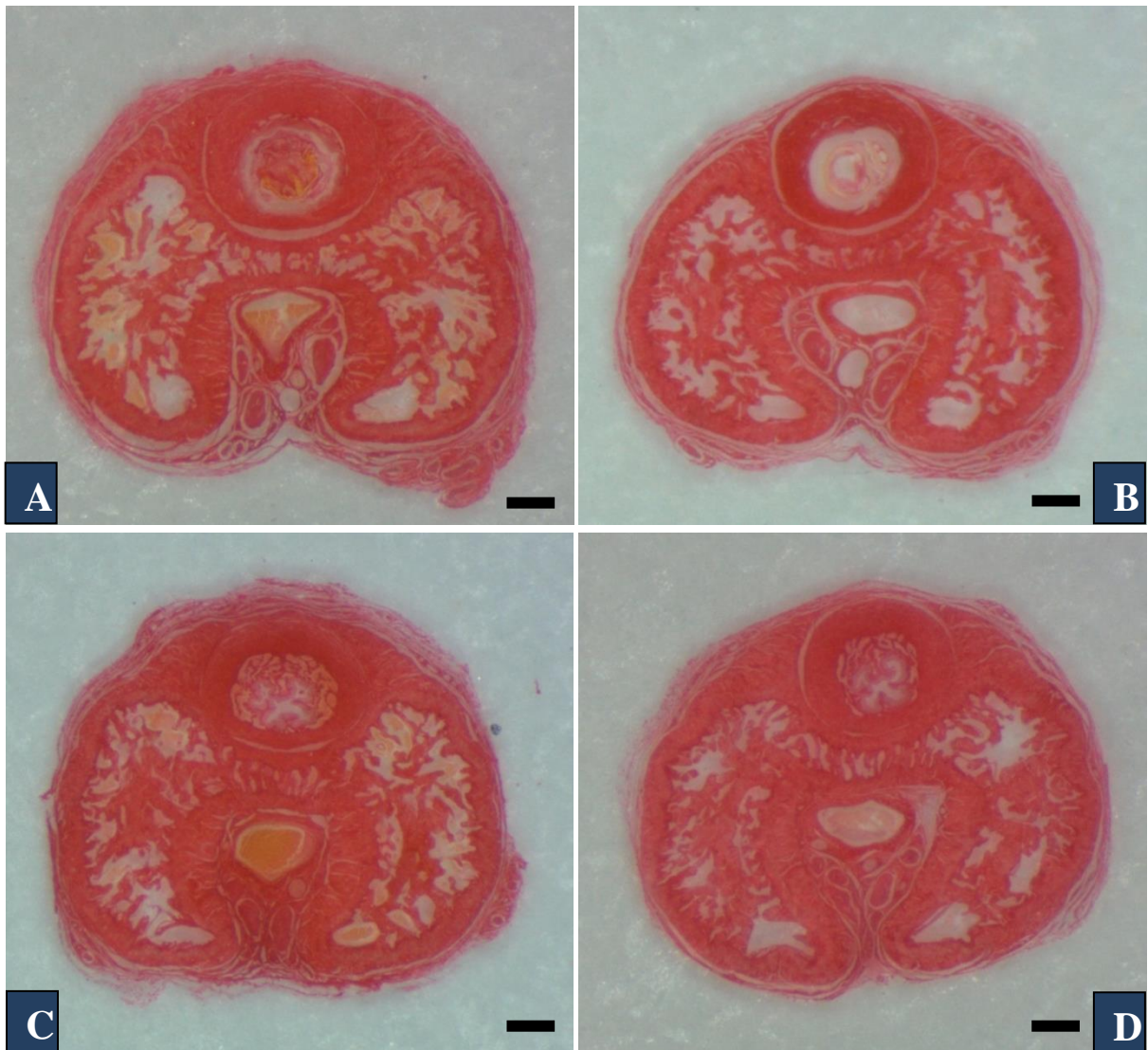


Legenda: Grupos C65 e T65 (gráfico à esquerda) e C105 e T105 (gráfico à direita). * $p < 0,05$

Nota: No gráfico à esquerda o grupo T65 apresentou um aumento de 7% comparada com o grupo C65, já o grupo T105 não apresentou uma diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo C105. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p > 0,05$)

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 12 -Fotomicrografia do corte transversal do pênis de ratos

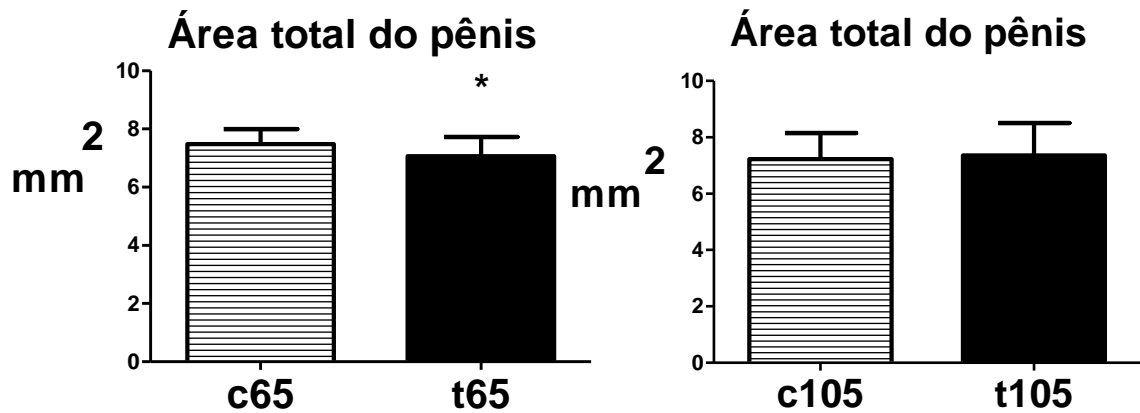


Legenda: Grupos: C65(A),T65(B), C105(C) e T105(D). Vermelho de picrosirius, aumento de 12x.

Nota: Imagem apenas ilustrativa da secção transversa do pênis de rato dos quatro grupos controle e tratados, púberes e adultos. Não é possível apreciar visualmente as diferenças morfológicas. A barra de escala representa 5 mm.

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 13 - Área total do pênis dos ratos

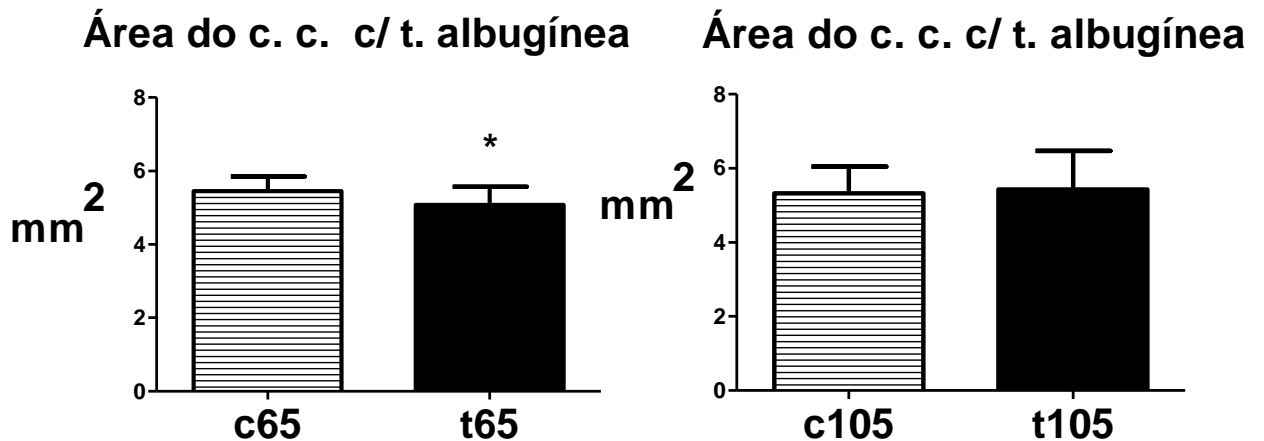


Legenda: Grupos C65 e T65 (gráfico à esquerda) e C105 e T105 (gráfico à direita). * $p < 0,05$.

Nota: No gráfico à esquerda o grupo T65 apresentou uma redução de 6% comparada com o grupo C65, já o grupo T105 não apresentou diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo C105. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 14 - Área do corpo cavernoso do pênis com túnica albugínea

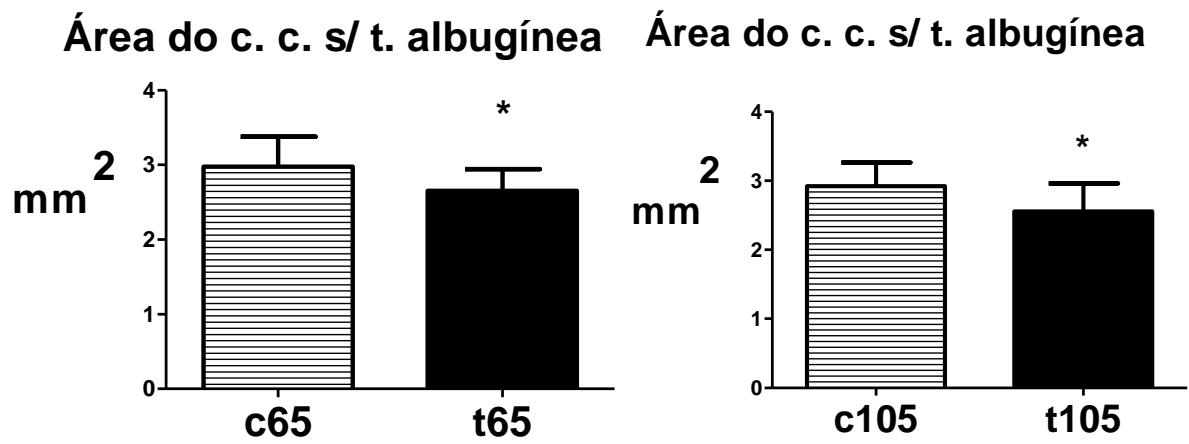


Legenda: Grupos C65 e T65 (gráfico à esquerda) e C105 e T105 (gráfico à direita). * $p < 0,05$.

Nota: No gráfico à esquerda o grupo T65 apresentou uma redução de 7% comparada com o grupo C65, já o grupo T105 não apresentou diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo C105. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 15 - Área do corpo cavernoso do pênis sem túnica albugínea

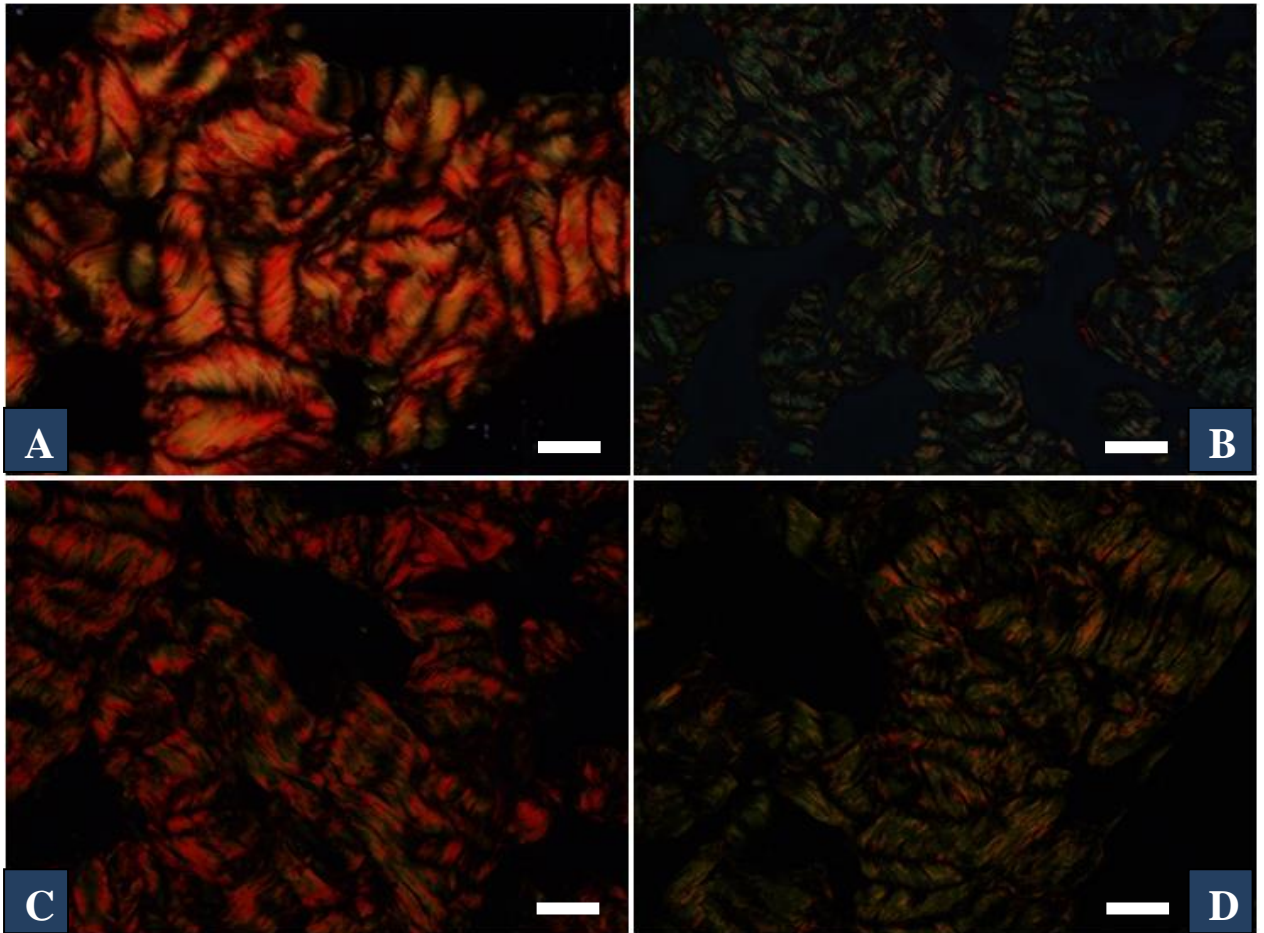


Legenda: Grupos C65 e T65 (gráfico à esquerda) e C105 e T105 (gráfico à direita). * $p < 0,05$.

Nota: No gráfico à esquerda o grupo T65 apresentou uma redução de 11% comparada com o grupo C65, já o grupo T105 apresentou uma redução de 13% comparada com o grupo C105. O asterísco (*) indica diferença estatística ($p > 0,05$).

Fonte: O Autor, 2015.

Figura 16. Fotomicrografia do corpo cavernoso de ratos



Legenda Grupos: C65 (A), T65 (B), C105 (C) e T105 (D). Vermelho de Picrosirius sob a luz polarizada, aumento de 400x.

Nota: Na figura A o grupo C65 padrão com predomínio em vermelho; em B o grupo T65 com predomínio em verde; Figura C grupo 105 apresentando um padrão misto (vermelho e verde); e em D no grupo T105 um predomínio em verde. A barra de escala representa 200 μ m.

Fonte: O Autor, 2015.

Enquanto os animais do grupo controle de 65 dias exibiram predomínio de fibras colágenas com birrefringência em vermelho, nos animais tratados de mesma idade o predomínio foi de fibras exibidas em verde, indicando que houve um “turnover” na deposição de colágeno no corpo cavernoso. Nos animais do grupo controle de 105 dias, as fibras colágenas mostraram um padrão misto, intercalando áreas com birrefringência em vermelho e verde enquanto que no grupo tratado da mesma idade o padrão predominante foi verde.

4 DISCUSSÃO

Hormônios androgênicos são importantes na diferenciação sexual e formação dos órgãos genitais masculinos (MURASHIMA et al., 2014). Mais do que isto, estes hormônios agem em outros tecidos não diretamente relacionados com o sistema genital, como o tecido adiposo e muscular (YESALIS et al., 1993, WANG et al. 2004). Com base nestes efeitos, muitos atletas, amadores e profissionais, jovens e adultos, têm utilizado de maneira indiscriminada os derivados sintéticos da testosterona. Os EAA têm maior potência que a testosterona e frequentemente são utilizados em doses que atingem concentrações muito maiores do que as fisiológicas (FRAGKAKI et al., 2008). Assim, com o aumento da massa muscular e diminuição da massa adiposa corpórea, estes usuários alcançam objetivos estéticos ou esportivos que normalmente não seriam alcançados sem o uso destes hormônios. Embora os EAA sejam drogas classificadas como classe III (utilidade clínica/Potencial moderado de abuso e dependência) e seu uso seja regulado por normas rígidas, o acesso ilegal à estas substâncias sem orientação médica é fácil (CORDARO et al., 2011).

Contudo, a alta concentração sérica destes hormônios acarreta mudanças fisiológicas importantes, que põem em risco a saúde do usuário. Além das alterações em órgãos vitais, como coração, rim e fígado (FRANKENFELD et al., 2014), os órgãos do sistema urogenital também têm sido apontados como afetados pelo uso de EAA em condições experimentais. No sistema urogenital, os EAA diminuem os níveis de testosterona endógena e de hormônios gonadotróficos, assim como o peso testicular, contagem de espermatozóides e a motilidade dos espermatozóides (SHAHIDI, 2001). Foi visto que a próstata de animais injetados com altas doses destes hormônios apresentam alterações morfológicas importantes, compatíveis com alterações funcionais (VARGAS et al., 2013). Porém, este é o primeiro estudo que investiga o pênis de ratos púberes e adultos após o uso de altas doses de EAA.

Um estudo anterior comparou o uso de testosterona, nandrolona e decanoato de nandrolona em ratos machos e comparou com um grupo controle. Os animais começaram a ser tratados com 26-27 dias de idade, recebendo injeções de 1mg de dois em dois dias por aproximadamente 4 semanas, sendo sacrificados com com 54-55 dias. O pênis foi uma das estruturas analisadas e nos resultados, esses autores não encontraram alterações estatisticamente significantes nas estruturas do corpo cavernoso, medidas pelo diâmetro transversal e antero-posterior (Khamanarong & Diloksambandh, 1985).

Os dados acima são não corroboram com os dados do nosso trabalho, onde foram encontradas importantes alterações tanto na área das estruturas eréteis quanto na composição do corpo cavernoso. Essas alterações ocorreram após o uso crônico do decanoato de nandrolona em ratos púberes e adultos comparados com os grupos controle de mesma idade.

De forma interessante, nos animais do presente estudo, nos quais um andrógeno sintético foi administrado, as alterações são comparáveis com aquelas observadas em animais com privação androgênica (diminuição do músculo liso, aumento do tecido conjuntivo e diminuição da área do pênis e/ou do corpo cavernoso) (MIRANDA et al., 2012). Uma vez que os EAA induzem uma diminuição na produção de testosterona endógena, as alterações penianas observadas podem ser decorrentes deste mecanismo de feedback negativo e estas mudanças são perfeitamente explicáveis, pois o pênis é um órgão altamente influenciado pela testosterona.

Em um estudo que submeteu ratos à privação androgênica, foi visto uma diminuição de 21% na área transversal do pênis. Nestes animais também foram observadas redução do músculo liso e do espaço sinusoidal do corpo cavernoso (MIRANDA et al., 2012). Em outro estudo, que induziu uma diminuição de 57% dos níveis séricos de testosterona, alterações no tecido erétil peniano também foram notadas, com diminuição do músculo liso e aumento do tecido conjuntivo cavernoso (DE SOUZA et al., 2012). Sabe-se que a testosterona é importante não só para a manutenção adequada das estruturas penianas, mas também em outros órgãos do sistema urogenital (GALLO et al., 2012)

Os elementos que compõem os corpos cavernosos (tecido conjuntivo, músculo liso, endotélio e espaço sinusoidal) precisam estar em proporções corretas para que a função erétil seja adequada. Foi mostrado que em indivíduos com disfunção erétil, a proporção destes elementos é alterada (COSTA et al., 2006). Assim, é possível que as alterações observadas nos animais submetidos à super-dosagem de EAA estejam ligadas a prejuízo na função erétil. Seria interessante, num futuro estudo, verificar a função erétil, através de cavernosometria, em animais que tenham utilizado altas doses de EAA.

A adolescência é um período bastante sensível para o desenvolvimento orgânico e sexual. Ocasionalmente este período de mudança desperta um interesse para a experimentação de drogas e sexo. A busca por uma aparência atlética, sem preocupações com os danos à saúde que o abuso dos EAA podem trazer, tem sido o motivo comum para o uso destas substâncias na adolescência. Alguns artigos mostram que muitas vezes o uso de anabolizantes por adolescentes é motivado pelo desejo de experimentar drogas de uso restrito, e não por um objetivo unicamente ligado à prática esportiva (LUMIA & MCGINNIS, 2010). Comumente,

os EAA são usados em associação com outras drogas como o álcool, o tabaco e drogas ilícitas (THORLINDSSON & HALLDORSSON, 2010). Esse perfil de usuário de esteróides parece ser bem distinto dos usuários adultos. Nestes o uso parece ser quase sempre associado à prática esportiva, com o objetivo de ganho muscular e perda de gordura corpórea para fins de competição. Contudo, sabe-se que muitos usuários adultos utilizam os esteróides por razão puramente estética, não estando inseridos em qualquer prática esportiva (COHEN et al., 2007).

É possível que o conhecimento fundamentado de que o uso de EAA promove alterações importantes no tecido peniano de ratos ajude a diminuir o uso indiscriminado destas drogas. Embora o aumento da massa muscular com possíveis melhorias estéticas e esportivas seja desejável pelos usuários, um possível dano ao tecido peniano é algo que pode desmotivar o uso destas drogas por muitos adolescentes e adultos jovens.

O tecido peniano dos ratos se difere do tecido humano, porém ambas as espécies possuem os mesmos componentes estruturais penianos e respondem de forma bastante parecida quando expostos a diferentes situações experimentais (FELIX-PATRÍCIO et al., 2014; PINHEIRO et al., 2000). O presente estudo observou as alterações nos pênis dos animais púberes e adultos jovens imediatamente após a utilização dos EAA. Não sabemos, contudo se após um período sem a utilização destas drogas, as alterações observadas podem ser revertidas ou se são permanentes.

CONCLUSÃO

O uso de doses supra-fisiológicas de esteróides anabólicos androgênicos promoveu mudanças estruturais no pênis de rato com alteração nas proporções estruturais dos tecidos dos corpos cavernosos. As alterações foram vistas tanto em animais que receberam o decanoato de nandrolona durante a puberdade quanto durante a idade adulta. As alterações ocorreram de forma mais pronunciada em animais adultos.

REFERÊNCIAS

- Albersen M.; Mwamukonda K.B.; Shindel A.W.; Lue T.F. Evaluation and treatment of erectile dysfunction. *Med Clin North Am.* 2011; 95(1): 201-212.
- Bahrke M.S.; Yesalis C.E.; Kopstein A.N.; Stephens J. A. Risk factors associated with anabolic-androgenic steroid use among adolescents. *Sports Med.* 2000; 29(6): 397-405.
- Bronson F.H.; Matherne C.M. Exposure to anabolic-androgenic steroids shortens life span of male mice. *Med Sci Sports Exerc.* 1997; 29(5): 615-619.
- Birch AJ. Hydroaromatic steroids hormones. 10-Nortesterone. *J Chem Soc.* 1950; 367-368.
- Clark A.S.; Harrold E.V.; Fast A.S. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav.* 1997; 31(1): 35-46.
- Cohen J.; Collins R.; Darkes J.; Gwartney D. A league of their own: demographics, motivations and patterns of use of 1,955 male adult non-medical anabolic steroid users in the United States. *J Int Soc Sports Nutr.* 2007; 11 : 4-12.
- Cordaro F.G.; Lombardo S.; Cosentino M. Selling androgenic anabolic steroids by the pound: identification and analysis of popular websites on the Internet. *Scand J Med Sci Sports.* 2011; 21(6): e247-259.
- Costa W.S.; Carrerete, F.B.; Horta W.G.; Sampaio F.J. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int.* 2006; 97(3): 567-569.
- Dai Y.T.; 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(1-2): 53-59.
- de Souza D.B.; Silva D.; Cortez C.M.; Costa W.S.; Sampaio F.J. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl.* 2012; 33(4): 735-739.
- Dickerman R.D, McConathy W.J, Zachariah N.Y. Testosterone, sex hormone-binding globulin, lipoproteins and vascular disease risk. *J Cardiovasc Risk.* 1997; 4(5-6): 363-366.
- Dohle G.R.; Smit, M.; Weber R.F. Androgens and male fertility. *World J. Urol.* 2003; 21(5): 341-345.
- Engel L. L; Alexander J.; Wheeler M. Urinary metabolites of administered 19-nortesterone. *J Biol Chem.* 1958; 231: 159-165.
- Farrell S.F; McGinnis M.Y. Long-term effect of pubertal anabolic androgenic steroid exposure on reproductive and aggressive behaviours in male rats. *Horm Behav.* 2004; 46(2): 193-203.

Feinberg M.J.; Lumia A.R.; McGinnis M.Y. The effect of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol Behav.* 1997; 62(1): 23-30.

Felix-Patricio B.; Medeiros J.L.; Jr.; De Souza D.B.; Costa W.S.; Sampaio F.J. Penile Histomorphometrical Evaluation in Hypertensive Rats Treated with Sildenafil or Enalapril Alone or in Combination: A Comparison with Normotensive and Untreated Hypertensive Rats. *J Sex Med.* 2015; 12(1): 39-47

Fortunato R.S.; Marassi M.P.; Chaves E A.; Nascimento J.H.; Rosenthal D.; Carvalho D.P. Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. *MedSci Sports Exerc.* 2006; 38(2): 256-261.

Fragkaki A.G.; Angelis Y.S.; Koupparis M.; Tsantili-Kakoulidou A.; Kokotos G.; Georgakopoulos C. Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids.* 2009; 74(2): 172-197.

Frankenfeld S.P.; Oliveira L.P.; Ortenzi V.H.; Rego-Monteiro I.C.; Chaves E.A.; Ferreira A.C.; Leitão A.C.; Carvalho D. P.; Fortunato R.S. The anabolic androgenic steroid nandrolonedecanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male Wistar rats. *PLoSOne.* 2014; 16- 9(9): e102699.

Gaillard J. L; Silberzahn P. Aromatization of 19-norandrogens by equine testicular microsomes. *J Biol Chem.* 1987; 262: 5717-5722.

Gallo C. B.; Miranda A. F.; Felix-Patricio B.; Ramos C. F.; Cardoso L. E.; Costa W. S.; Sampaio F. J. Effects of castration and hormone replacement in the urinary bladder of rats: structural, ultrastructural, and biochemical analysis. *J Androl.* 2012; 33(4): 684-690.

Gooren L.J.; Saad F. Recent insights into androgen action on the anatomical and physiological substrate of penile erection. *Asian J Androl.* 2006; 8(1): 3–9.

Granata A.R.; Rochira V.; Lerchl A.; Marrama P.; Carani C. Relationship between sleep-related erections and testosterone levels in men. *J Androl.* 1997; 18(5): 522–527.

Guyton A.C.; Hall J. E. *Fisiologia humana e mecanismos das doenças.* Sexta edição.1997.

Handelsman D.J. Testosterone: Use, misuse and abuse. *Med J Aus.* 2006 16; 185(8): 436–439.

Hartgens F.; Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 2004; 34(8): 513-554.

Hayes F.J; DeCruz S.; Seminara S.B.; Boepple P.A.; Crowley W.F.Jr. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(1): 53–58.

Junqueira L.C.; Carneiro J. *Histologia Básica.* 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008.

- Khamanarong K.; Diloksambandh V. The androgenic activities of nandrolone phenylpropionate and nandrolone decanoate in comparing to testosterone propionate. *J Med Assoc Thai.* 1985; 68(7): 361-72.
- Lucía A.; Chicharro J.L.; Pérez M.; Serratosa L.; Bandrés F.; Legido J.C. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *J Appl Physiol* (1985). 1996; 81(6): 2627-2636.
- Lumia A.R.; McGinnis M.Y. Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. *Physiol Behav.* 2010; 100(3): 199-204.
- Mills T.M.; Reilly C.M.; Lewis R.W. Androgens and penile erection: a review. *J Androl.* 1996; 17(6): 633–638.
- Miranda A.F.; Gallo C.B.; De Souza D.B.; Costa W.S.; Sampaio F.J. Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. *J Androl.* 2012; 33(6): 1224-1232.
- Montes G.S.; Junqueira L.C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86 Suppl 3: 1-11.
- Murashima A.; Kishigami S.; Thomson A.; Yamada G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1849(2): 163-170.
- Pinheiro A.C.; Costa W.S.; Cardoso L.E.; Sampaio F.J. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol.* 2000; 164:1802-1806.
- Pitteloud N.; Dwyer, A.A.; DeCruz S.; Lee H.; Boepple P.A.; Crowley W.F.Jr.; Hayes F.J. The relative role of gonadal sex steroids and gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(7): 2686–2692.
- Pope H.G.Jr.; Katz D.L. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. *Arch Gen Psychiatry.* 1994; 51(5): 375-382.
- Quinlan D.M.; Nelson R.J.; Partin A.W.; Mostwin J.L.; Walsh, P.C. The rat as a model for the study of penile erection. *J Urol.* 1989; 141(3): 656-661.
- Shahidi T.N. Review of chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Titer.* 2001; 23(9): 1355-1390.
- Shen Z.J.; Zhou X.L.; LU Y.L.; Chen Z.D. Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian J Androl.* 2003; 5 (1): 33–36.
- Shokri S.; Aitken R.J.; Abdolvahabi M.; Abolhasani F.; Ghasemi F.M.; Kashani I.; Ejtemaimehr S.; Ahmadian S.; Minaei B.; Naraghi M.A.; Barbarestani M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010; 106(4): 324-330.

Singh P. Andropause: Current concepts. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013; 17(Suppl 3): S621-629.

Thorlindsson T.; Halldorsson V. Sport, and use of anabolic androgenic steroids among Icelandic high school students: a critical test of three perspectives. *Subst Abuse Treat Prev Policy.* 2010; 5: 32.

Traish A.M.; Guay A.T. Are androgens critical for penile erections in humans? Examining the clinical and preclinical evidence. *J Sex Med.* 2006; 3(3): 382–404; discussion 404–407.

Vargas R.A.; Oliveira L.P.; Frankenfeld S.; Souza D.B.; Costa W.S.; Favorito L.A.; Sampaio F.J. The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats. *Int Braz J Urol.* 2013; 39(5): 675-682.

Wang C.; Cunningham G.; Dobs A.; Iranmanesh A.; Matsumoto A. M.; Snyder P.J.; Weber T.; Berman N.; Hull L, Swerdloff R. S. Long-term testosterone gel (AndroGel) treatment maintains beneficial effects on sexual function and mood, lean and fat mass, and bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(5): 2085-2098.

Yesalis C.E.; Kennedy N.J.;Kopstein A.N.; Bahrke M.S. Anabolic-androgenic steroid use in the United States. *JAMA.* 1993; 270(10): 1217-1221.

APÊNDICE - Artigo científico referente à dissertação

5 - ORIGINAL ARTICLE EXPERIMENTAL UROLOGY

Morphometric study of the corpus cavernosum after anabolic androgenic steroid administration in pubertal and adult rats¹

Alessandro de Sousa Mendes de Sena^I, Rafael Areas Vargas^{II}, Diogo Benchimol De Souza^{III}, Waldemar Silva Costa^{IV}, Francisco José Sampaio^V

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150070000005>

^IFellow Master degree, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript preparation.

^{II}Master, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil. Acquisition of data, manuscript preparation.

^{III}PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript preparation.

^{IV}PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil. Conception and design of the study, interpretation of data, manuscript preparation.

^VPhD, Full Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil. Conception and design of the study, critical revision.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the penile morphological modifications of pubertal and adult rats chronically treated with supra-physiological doses of anabolic androgenic steroids.

METHODS: Forty-eight male Wistar rats were distributed into four groups: two control groups, 105- and 65-day-old (C105 and C65, respectively) injected with peanut oil (vehicle); and two treated groups, 105- and 65-day-old (T105 and T65, respectively) injected with nandrolone decanoate at a dose of 10 mg Kg⁻¹ of body weight. The rats were injected once a week for eight weeks. The rats were then killed and their penises were processed for histomorphometric analyses. The mean of each parameter was statistically compared.

RESULTS: A corpus cavernosum reduction of 12.5% and 10.9% was observed in the T105 and T65 groups, respectively, when compared with their respective control groups. The cavernosum smooth muscle surface density diminished by 5.6% and 12.9% in the T65 and T105 groups, respectively, when compared with their controls. In contrast, the sinusoidal space increased by 17% in the T105 group and decreased by 9.6% in the T65 group.

CONCLUSION: The use of supra-physiological doses of AAS promotes structural changes in the rat penis, by altering the proportions of corpus cavernosum tissues, in both pubertal and adult treated animals.

Key words: Penis. Anabolic Agents. Erectile Dysfunction. Rats.

Introduction

Anabolic androgenic steroids (AAS) are synthetic testosterone derivatives that can have major effects on the human body. It is known that both testosterone and AAS diminish body fat and increase muscle mass and, thus, improve athletic performance. This effect has prompted indiscriminate AAS use by professional and amateur athletes, both youth and adults, in an attempt to improve their sport performance¹.

One study showed that 1 to 3 million men and women in the United States have used AAS². According to some authors, these drugs are commonly used in doses 10- to 100-fold greater than the physiological levels, involving a single drug or a mixture of various AAS³⁻⁷.

Many side effects of this practice have been reported, including disorders of the urogenital system⁸. It is known that high doses of nandrolone decanoate reduce testicular volume and the length of the seminiferous tubules in rats⁹. AAS can also decrease the weight and volume of the prostate, and increase the prostatic epithelium width in rats¹⁰.

Regarding the penis, it is well known that adequate levels of testosterone are necessary to maintain its normal morphology and the proper functioning of erectile bodies^{11,12}. Therefore, it was hypothesized that AAS may affect penile morphology. To the best of our knowledge, there is no information on the effects of supra-physiological doses of AAS on the corpus cavernosum tissue. Thus, this study aimed to assess the penile morphological modifications of pubertal and adult rats chronically treated with supra-physiological doses of AAS.

Methods

All experiments were performed in accordance with the Brazilian laws for scientific use of animals, and the project was approved by the local ethics committee (protocol no. CEUA/036/2012).

We studied 48 male Wistar rats which were kept in a room with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and an artificial dark-light cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). They were fed standard rat food and water *ad libitum*. The rats were distributed into four groups: control rats 105-day-old (C105) (n = 10), control rats 65-day-old (C65) (n = 14) injected only with the carrier (peanut oil), treated rats 105-day-old (T105) (n = 10), and treated rats 65-day-old (T65) (n = 14). The treated rats (T65 and T105) were injected with nandrolone decanoate at a dose of 10 mg Kg⁻¹ of body weight while the control groups (C65 and C105)

were injected with 90% peanut oil (diluted in benzoic alcohol) as carrier^{1,10}. Both the steroid hormone and carrier were administered by intramuscular injection once a week for eight weeks. This treatment protocol was established to simulate a commonly used protocol in humans during puberty or at early adulthood, as previously published elsewhere^{1,10}.

The rats were killed by anesthetic overdose (intraperitoneal thiopental injection) when they were 161- (C105 and T105) or 121-day-old (C65 and T65). The penises were dissected and fixed in 4% buffered formalin. The penile mid-shaft was processed for paraffin embedding to obtain 5- μm sections, which were stained with picosirius red or Masson's trichrome.

Images of the cross-sections stained with picosirius red were captured under x12 magnification with a digital camera (AxionCan ERC5S, Karl Zeiss, Gottingen, Germany) coupled to a stereomicroscope (SteREO Discovery V8, Karl Zeiss, Gottingen, Germany). In these images, the cross-sectional areas of the penis, corpus cavernosum (with and without tunica albuginea), and tunica albuginea alone were measured in mm² using the ImageJ software (version 1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, USA) using the "Free Hand" tool after calibration. The area of the tunica albuginea was estimated by the difference in the areas of the corpus cavernosum with and without the tunica albuginea¹³.

In these sections stained with picosirius red, by observation under x400 magnification and polarized light, the collagen types of corpus cavernosum were differentiated as types III (in green) and I (red/orange)¹⁴. These images were captured with a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan).

The surface densities (Sv) of the corpus cavernosum connective tissue, sinusoidal space, and smooth muscle were measured by examining cross-sections stained with Masson's trichrome. For each animal, 25 corpus cavernosum photomicrographs were obtained under x400 magnification. The density of each of these structures was expressed as a percentage obtained by the point-counting method¹¹. Briefly, a 100 points grid was superimposed over the images using the "grid" tool of the ImageJ software, and each structure touched by one point was counted as a connective tissue, sinusoidal space, smooth muscle, or other structure. The "cell counter" tool of the ImageJ program was used to count each structure separately.

For each parameter, the mean of each control group was compared to its age-matched treated group. Results were first analyzed using the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. Parametric data were then compared using the Student's *t*-test, while nonparametric data were compared using the Mann-Whitney test. For

Sena ASM *et al.*

all analyses, two-tailed tests were used. All analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, USA). Mean differences were considered significant at $p < 0.05$. All results are presented as means \pm standard deviation.

Results

Penile cross-sectional area

There was no difference on the penis cross-sectional area between the adult groups (C105 vs T105). When comparing the results of pubertal animals, a 5.6% reduction in the penile cross-sectional area was observed in T65 animals compared to C65 animals.

Corpus cavernosum cross-sectional area with and without the tunica albuginea

The cross-sectional area of the corpus cavernosum with the tunica albuginea was similar between C105 and T105 animals, but a 12.5% reduction in the corpus cavernosum without the tunica albuginea of the treated animals was observed compared to their age-matched controls.

Regarding the pubertal treated animals (T65), the area of the corpus cavernosum with and without the tunica

albuginea was 6.9% and 10.9% smaller, respectively, than in C65 animals.

Tunica albuginea cross-sectional area

The cross-sectional area of the tunica albuginea was similar among the pubertal animals. When comparing the C105 and T105 groups, a 20% area increase was recorded in C105 animals.

Corpus cavernosum connective tissue density

When analyzing the connective tissue by point-counting planimetry, we observed a 6.8% increase in connective tissue density in the T65 group compared to the C65 group. T105 animals showed connective tissue density values similar to those of C105 animals (Figure 1).

Corpus cavernosum sinusoidal space density

Sinusoidal space density analysis showed a 9.6% reduction in group T65 compared to the C65 group. The density of the adult treated group (T105) was 17% higher than that of the C105 group (Figure 1).

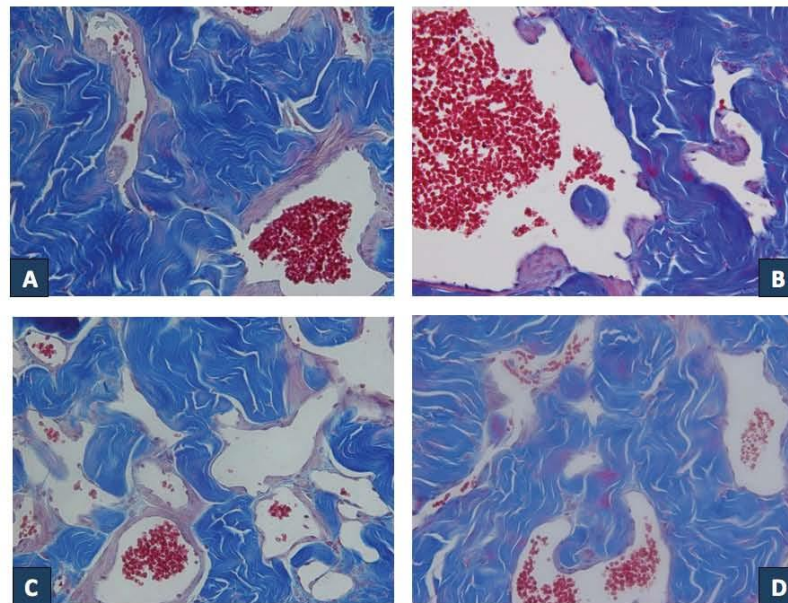


FIGURE 1 - Photomicrograph of penile corpus cavernosum from rats showing the differences among control animals and animals treated with anabolic androgenic steroids. A) Group C105; B) Group T105; C) Group C65; D) Group T65. Masson's Trichrome, x400.

Morphometric study of the corpus cavernosum after anabolic androgenic steroid administration in pubertal and adult rats

Corpus cavernosum smooth muscle density

Corpus cavernosum smooth muscle density was 5.6% lower in the pubertal treated group than in its control group. In

the adult groups, the T105 group showed a 12.9% reduction when compared with the C105 group (Figure 1). All the morphometric data of pubertal and adult animals are shown in Tables 1 and 2, respectively.

TABLE 1 - Penile morphometrical data from pubertal control animals (C65) and animals treated with supra-physiological doses of androgenic anabolic steroids (T65).

	C65	T65	p value
Penile cross-sectional area (mm²)	7.48 ± 0.52	7.06 ± 0.66	< 0.01
Corpora cavernosa area with tunica (mm²)	5.45 ± 0.39	5.07 ± 0.49	< 0.01
Corpora cavernosa area without tunica (mm²)	2.98 ± 0.39	2.65 ± 0.29	< 0.001
Area of the tunica albuginea (mm²)	2.47 ± 0.27	2.55 ± 0.48	0.70
Sv of the sinusoidal space (%)	28.7 ± 11.6	26.0 ± 10.2	< 0.05
Sv of connective tissue (%)	54.1 ± 13.4	57.8 ± 11.9	< 0.01
Sv of smooth muscle tissue (%)	16.0 ± 5.4	15.1 ± 5.0	< 0.05

Data are presented as means ± standard deviation. Data was compared by Student's *t*-test considering significant at $p < 0.05$. Sv, surface density.

TABLE 2 - Penile morphometrical data from adult control animals (C105) and animals treated with supra-physiological doses of androgenic anabolic steroids (T105).

	C105	T105	p value
Penile cross-sectional area (mm²)	7.22 ± 0.92	7.35 ± 1.16	0.57
Corpora cavernosa area with tunica (mm²)	5.32 ± 0.71	5.43 ± 1.03	0.66
Corpora cavernosa area without tunica (mm²)	2.92 ± 0.34	2.55 ± 0.40	< 0.01
Area of the tunica albuginea (mm²)	2.40 ± 0.45	2.88 ± 0.70	< 0.05
Sv of the sinusoidal space (%)	24.5 ± 8.2	28.7 ± 13.8	< 0.05
Sv of connective tissue (%)	59.5 ± 11.1	57.2 ± 15.5	0.40
Sv of smooth muscle tissue (%)	15.1 ± 6.3	13.1 ± 4.6	< 0.01

Data are presented as means ± standard deviation. Data was compared by Student's *t*-test considering significant at $p < 0.05$. Sv, surface density.

Collagen types

Picrosirius red-stained cross sections of corpus cavernosum observed under polarized light of both T65 and T105 animals showed a higher predominance of green collagen (collagen type III), compared to the control animals. The latter showed a greater amount of red/orange collagen.

Discussion

It is well known that androgenic hormones are important in sexual differentiation and male genital organ formation¹⁵. Furthermore, testosterone acts on other tissues that are not directly related to the genital system such as the adipose and muscle tissues^{16,17}. Because of these effects, many athletes, both professionals and amateurs, youths and adults, use synthetic

testosterone derivatives irresponsibly. Anabolic androgenic steroids are more powerful than testosterone and are often used at much higher concentrations than the physiological levels. Their use results in muscle mass increase and adipose mass decrease, enabling users to achieve aesthetic results or athletic performances that could not be obtained without the use of these hormones. Although AAS are Class III drugs, with their use being subject to strict rules, illegal access to these substances without medical guidance is easy¹⁸.

However, besides the desired esthetic and/or athletic effects, high serum concentrations of these hormones cause important negative physiological changes that jeopardize the health of users. In addition to changes in vital organs such as the heart, kidneys, and liver, studies have shown that urogenital system organs are also affected. For example, the prostate and testes of animals injected with these hormones show pronounced

Sena ASM *et al.*

morphological changes, compatible with functional alterations⁸⁻¹⁰. Several studies have considered the effects of AAS; however, to the best of our knowledge, this is the first study to characterize the penis of rats after AAS use.

We observed important alterations both in the cross-sectional area of erectile structures and in corpus cavernosum composition after the chronic use of nandrolone decanoate in rats. These changes could be explained because the penis is an organ that responds strongly to testosterone.

In a study in which rats were subjected to androgen deprivation, a 21% reduction in the penis cross-sectional area was observed. These animals also showed reduced smooth muscle and sinusoidal space in the corpus cavernosum¹². Changes in the penile erectile tissue were also noted in another study where the serum level of testosterone was 57% reduced. This reduction resulted in smooth muscle reduction and cavernosum connective tissue increase¹¹.

Interestingly, in the present study, animals treated with synthetic androgen showed changes comparable to those seen on animals subjected to androgen deprivation (i.e., smooth muscle reduction, connective tissue increase, and penis and/or corpus cavernosum area reduction). Since AAS are known to depress the production of endogenous testosterone, the changes observed might be due to this negative feedback mechanism. The measurement of serum testosterone levels in animals receiving AAS would be of interest for further explaining this theory.

Correct proportions of the elements that compose the corpus cavernosum (connective tissue, smooth muscle, endothelium, and sinusoidal space) are required for proper erectile function. It has been demonstrated that in individuals with erectile dysfunction, the proportions of these elements are altered¹⁹. Therefore, it is possible that the changes observed in animals treated with high AAS doses might be associated with impaired erectile function. Thus, in future studies, it would be interesting to check erectile function by cavernosometry in animals treated with high AAS doses.

Adolescence is a highly sensitive period for organic and sexual development. Often at this period, an interest for experimenting with drugs and sex is developed. In addition, the desire to improve their athletic appearance prompts some adolescents to abuse AAS without considering the negative side effects. Several articles have also shown that the use of anabolic steroids by teenagers is sometimes motivated purely by a desire to experiment with restricted drugs and not by a desire to enhance their appearance and/or sport performance²⁰. AAS are also commonly used along with other legal drugs (alcohol and tobacco) as well as with illegal substances²¹. The profile of young steroid

users appears to be distinct from that of adult users, whose steroid use is usually associated with sport practice in order to gain muscle mass and lose body fat. In addition, it is known that many adults also use steroids for purely esthetic purposes²².

The knowledge that AAS use promotes pronounced changes in the penile tissue of rats might discourage the abusive use of these drugs. The risk of penile damage might outweigh the desire to improve their appearance and sport performance in many adolescents and young adults.

In the present study, we observed changes in the penises of pubertal and adult animals immediately after AAS treatment. However, we cannot determine whether the changes caused by the use of these drugs are permanent or whether the changes could be restored after their use is discontinued. Also, studying the effects of other dosages and schemes of AAS administration on penile morphology would be of interest since different drugs, doses and schemes are used by athletes. Finally, although the penile tissue of rats differs from that of humans, the two species possess the same penile structural components and respond very similarly when exposed to many experimental situations^{13,23}. Thus, the results obtained in our study are likely to be relevant to humans.

Conclusion

The use of supra-physiological doses of anabolic androgenic steroids promotes structural changes in the rat penis, by altering the proportions of corpus cavernosum tissues, in both pubertal and adult treated animals.

References

1. Fortunato RS, Marassi MP, Chaves EA, Nascimento JH, Rosenthal D, Carvalho DP. Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Feb;38(2):256-61. doi: 10.1249/01.mss.0000183357.19743.51.
2. Bahrke MS, Yesalis CE, Kopstein AN, Stephens JA. Risk factors associated with anabolic-androgenic steroid use among adolescents. *Sports Med.* 2000 Jun;29(6):397-405. doi: 10.2165/00007256-200029060-00003.
3. Bronson FH, Matherne CM. Exposure to anabolic-androgenic steroids shortens life span of male mice. *Med Sci Sports Exerc.* 1997 May;29(5):615-9. doi: 10.1097/00005768-199705000-00005.
4. Clark AS, Harrold EV, Fast AS. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav.* 1997 Feb;31(1):35-46. PMID: 9109597.
5. Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effect of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol Behav.* 1997 Jul;62(1):23-30. PMID: 9226338.
6. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 2004 34(8):513-54. PMID: 15248788.

Morphometric study of the corpus cavernosum after anabolic androgenic steroid administration in pubertal and adult rats

7. Pope HG, Jr., Katz DL. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. *Arch Gen Psychiatry*. 1994 May;51(5):375-82. doi: 10.1001/archpsyc.1994.03950050035004.
8. Lucia A, Chicharro JL, Perez M, Serratos L, Bandres F, Legido JC. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *J Appl Physiol*. 1996 Dec;81(6):2627-36. PMID: 9018515.
9. Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, Ejtemaemehr S, Ahmadian S, Minaei B, Naraghi MA, Barbarestani M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010 Apr;106(4):324-30. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00495.x.
10. Vargas RA, Oliveira LP, Frankenfeld S, Souza DB, Costa WS, Favorito LA, Sampaio FJ. The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats. *Int Braz J Urol*. 2013 Sep-Oct;39(5):675-82. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2013.05.10.
11. de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl*. 2012 Jul-Aug;33(4):735-9. doi: 10.2164/jandrol.111.014225.
12. Miranda AF, Gallo CB, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. *J Androl*. 2012 Nov-Dec;33(6):1224-32. doi: 10.2164/jandrol.112.017012.
13. Felix-Patricio B, Medeiros JL, Jr., De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: a comparison with normotensive and untreated hypertensive rats. *J Sex Med*. 2015 Jan;12(1):39-47. doi: 10.1111/jsm.12750 .5 Jan;12(1):39-47.
14. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996 Jan;20(1):15-27. doi: 10.1006/cbir.1996.0004.
15. Murashima A, Kishigami S, Thomson A, Yamada G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1849(2):163-170. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.05.020.
16. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morales A, Morley JE, Schulman C, Thompson IM, Weidner W, Wu FC. Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA, and ASA recommendations. *J Androl*. 2009 Jan-Feb;30(1):1-9. doi: 10.2164/jandrol.108.006486.
17. Yesalis CE, Kennedy NJ, Kopstein AN, Bahrke MS. Anabolic-androgenic steroid use in the United States. *JAMA*. 1993 Sep 8;270(10):1217-21. doi: 10.1001/jama.1993.03510100067034.
18. Cordaro FG, Lombardo S, Cosentino M. Selling androgenic anabolic steroids by the pound: identification and analysis of popular websites on the Internet. *Scand J Med Sci Sports*. 2011 Dec;21(6):e247-59. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01263.x.
19. Costa WS, Carreterete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int*. 2006 Mar;97(3):567-9. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05917.x.
20. Lumia AR, McGinnis MY. Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. *Physiol Behav*. 2010 Jun;100(3):199-204. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.01.007.
21. Thorlindsson T, Halldorsson V. Sport, and use of anabolic androgenic steroids among Icelandic high school students: a critical test of three perspectives. *Subst Abuse Treat Prev Policy*. 2010 Dec 20;5:32De. doi: 10.1186/1747-597X-5-32.
22. Cohen J, Collins R, Darkes J, Gwartzney D. A league of their own: demographics, motivations and patterns of use of 1,955 male adult non-medical anabolic steroid users in the United States. *J Int Soc Sports Nutr*. 2007 Oct;4:12. PMID: 17931410.
23. Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE, Sampaio FJ. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol*. 2000 Nov;164(5):1802-6. doi: 10.1016/S0022-5347.

Correspondence:

Diogo Benchimol De Souza
Avenida 28 de Setembro, 87
20562-030 Rio de Janeiro – RJ Brasil
Tel./Fax: (55 21)2868-8399
diogobenchimol@gmail.com

Received: March 14, 2015

Review: May 13, 2015

Accepted: June 15, 2015

Conflict of interest: none

Financial sources: CNPq, FAPERJ, CAPES

¹Research performed at Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil.

ANEXO – Parecer do Comitê de Ética sobre o estudo



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

ibrag Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/050/2012** sobre “**ANÁLISE DA PRÓSTATA, DO PÊNIS E DOS TESTÍCULOS DE RATOS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ESTEROIDE ANABÓLICO ANDROGÊNICO**”, sob a responsabilidade de **Waldemar da Silva Costa**, 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 (CEUA), em **22/08/2012**. Este certificado expira em **22/08/2016**.

Rio de Janeiro, 22 de Agosto de 2012.

Matos

Patricia Cristina Lisboa

Profa. Patricia Cristina Lisboa

CEUA/IBRAG/UERJ

Prof^ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof^ª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

/ass

Prof. Israel Felzenszwalb

CEUA/IBRAG/UERJ