

DENNY FABRÍCIO MAGALHÃES VELOSO

REPERCUSSÕES SISTÊMICAS DA ORQUIECTOMIA BILATERAL,
EM RATOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIRURGIA

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte, Minas Gerais

2007

DENNY FABRÍCIO MAGALHÃES VELOSO

REPERCUSSÕES SISTÊMICAS DA ORQUIECTOMIA BILATERAL, EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Andy Petroianu

Belo Horizonte

2007

REPERCUSSÕES SISTÊMICAS DA ORQUIECTOMIA, EM RATOS

DENNY FABRÍCIO MAGALHÃES VELOSO

Nível: Mestrado

Data da defesa: 24 / 09 / 2007

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Comissão Examinadora formada pelos Professores:

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

Prof. Dr. Andy Petroianu - orientador

AGRADECIMENTOS – AUXÍLIOS INSTITUCIONAIS**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitor: Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Francisco José Penna

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Carlos Faria Santos
Amaral

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. Walter Antônio Pereira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia: Prof. Dr. Edson
Samesima Tatsuo

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Andy Petroianu

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Marco Antônio Gonçalves Rodrigues

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Juliano Alves Figueiredo (representante discente)

Instituições de Financiadores

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

À minha esposa Denise, pela compreensão, apoio e incentivo.

Aos meus pais Romulo e Dora, mestres do conhecimento exato e da vida, meus
paradigmas.

Aos meus irmãos Lucy, Jeane e Thiago, pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Luiz Ronaldo Alberti pelo exemplo, orientação e amizade.

Ao Grupo de Pesquisa Avanços em Medicina pelo incentivo e pela formação crítica do saber. Em especial, aos meus amigos Bruno Gustavo Muzzi Carvalho e Carneiro, Fábio Gontijo Rodrigues, Fernando Henrique Oliveira Carmo Rodrigues, Gustavo Rocha Costa, Juliano Alves Figueiredo, Kelly Cristine de Lacerda Rodrigues, Kelly Renata Sabino e Leonardo de Souza Vasconcellos que atuaram diretamente na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nilo Resende Viana Lima pela orientação ao estudo de exercício físico de ratos.

Ao Prof. Dr. Carlos Jorge Simal Rodrigues pela orientação ao estudo cintilográfico.

À Heather Lynn Hauter pelas traduções para a língua inglesa.

À Dr^a. Cristiana Buzelin Nunes e Dr. Maurício Buzelin Nunes pela orientação aos estudos de histologia.

Ao Prof. Dr. Alfredo José Afonso Barbosa pelas orientações nos estudos de histologia.

Ao Prof. Dr. Mauro Ivan Salgado pelo auxílio no estudo da cicatrização.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, Derlim Severiano de Paula e Marcelo Moreira de Jesus, pela alimentação e cuidado com os animais.

Aos funcionários do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, que foram disponíveis sempre que precisei, especialmente Adriana Santos de Oliveira, Camilla Spínula Dino, Egly da Conceição Vieira, Élen

Cristina de Jesus, Isabella Santana dos Anjos, Jhonatan dos Santos Lopes, Maria José Brito de Melo Andrade, Maricrislei Rocha Torres, Renata Ribeiro Viana e Valéria Solar Cabral.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina da UFMG pelo auxílio desde a minha graduação até a normatização desta tese, especialmente Almiro Venâncio da Silva, Bernadete Sirangelo Dutra, Cibele de Lourdes B F Silva, Delfino Alves da Silva, Elton José Henrique da Silva, Elza Helena Almeida Hugo, Iraci Teixeira Nogueira, José Rodrigues Campos, Maria Consolação Palmeira Lopes, Maria de Fátima Pereira Goulart, Maria do Rosário F Vasconcelos, Maria Eunice Basília Fernandes, Marília de Fátima B Carvalho, Mariza Cristina Torres Talim, Marizete Coelho, Mirtes Rauen Lopes Fernandes, Nanci Ferreira L Carneiro, Paulo Ferreira Silva, Paulo Roberto do Prado, Raílda Hermes de Souza, Sara Vasconcelos Garcia e Vera Lúcia Quaresma Chaves e pela FUNDEP Claudinei Correia Lopes, Dedison Justino Neto e Nanci Baldelli.

Aos amigos dos Serviços de Cirurgia Geral do Hospital Júlia Kubitschek e de Urologia do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte pelo incentivo na realização desta pesquisa.

Aos membros da banca de pré-defesa Dr Cláudio Leo Gelape, Dr Clécio Piçarro e Dr Paulo Guilherme de Oliveira Salles pelas valorosas contribuições.

Aos membros da banca de defesa Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, Prof. Dr. Ubirajara Ferreira, Prof. Dr. Otto Henrique Torres Chaves e Prof. Mestre Reginaldo Martello pelos ensinamentos marcantes e pelas indagações que nos fazem alcançar nossos objetivos.

ÍNDICE GERAL

1	RESUMO	1
2	ABSTRACT	4
3	INTRODUÇÃO	7
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
4.1	Deficiência Androgênica	9
4.2	Testosterona e Espessura Supra-Renal	10
4.3	Lipidograma	11
4.4	Cicatrização e Glicemia	11
4.5	Peso e Pressão Arterial	12
4.6	Capacidade Física	12
4.7	Sistema Mononuclear Fagocitário	13
5	OBJETIVOS	14
6	MÉTODO	15
6.1	Animais Utilizados e Cuidados Gerais	15
6.2	Distribuição dos Animais	16
6.3	Técnica Anestésica e Cirúrgica	16
6.4	Estudos Realizados nos Animais Controle e Orquiectomizados	17
6.4.1	Estudo A: Peso dos animais, morfologia da glândula adrenal	17

6.4.2	Estudo B: Avaliação da glicemia e do lipidograma	20
6.4.3	Estudo C: Exercício físico e peso corporal	21
6.4.4	Estudo D: Pressão arterial	23
6.4.5	Estudo E: Função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário	26
6.4.6	Estudo F: Resistência cicatricial cutânea	27
7	RESULTADOS	30
7.1	Avaliação dos Resultados Obtidos em Cada Etapa do Estudo	30
7.1.1	Estudo A: Peso dos animais, morfologia da glândula adrenal	30
7.1.2	Estudo B: Avaliação da glicemia e do lipidograma	32
7.1.3	Estudo C: Exercício físico e peso corporal	33
7.1.4	Estudo D: Pressão arterial	34
7.1.5	Estudo E: Função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário	35
7.1.6	Estudo F: Resistência cicatricial cutânea	36
8	DISCUSSÃO	39
9	CONCLUSÕES	46
10	REFERÊNCIAS	47

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1 - Valores do peso corporal, da testosterona livre e da espessura da glândula adrenal de ratos dos Grupos 1, 2i e 2t	31
Tabela 2 – Valores de exames bioquímicos do sangue de ratos colhidos 5 meses após as operações	33
Tabela 3 – Valores de peso e tempo de corrida de ratos dos Grupos 1 e 2, cinco meses após as operações	34
Tabela 4 – Valores da pressão arterial média da cauda de ratos dos grupos 1 e 2	34
Tabela 5 - Comparação dos valores percentuais de radiação em cada grupo entre animais orquiectomizados e controle de ratos jovens e adultos	36
Tabela 6 – Resistência cicatricial em pele de ratos no 7 ^o dia e no 21 ^o dia após incisão cutânea	37

ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA 1 - Rato durante a corrida sobre uma esteira	22
FIGURA 2 - Pletismógrafo para avaliar a pressão da artéria caudal do rato	25
FIGURA 3 - Equipamento utilizado para o teste de resistência cicatricial	29
FIGURA 4 - Medida da espessura cortical da glândula adrenal	32
FIGURA 5 - Corte histológico da cicatriz cutânea do animal do Grupo– controle, no 21º dia pós-operatório	38
FIGURA 6 - Corte histológico da cicatriz cutânea do animal orquiectomizado, no 21º dia pós-operatório	38

1 RESUMO

Este trabalho teve por objetivo verificar se o hipogonadismo por castração cirúrgica provoca alterações no organismo de ratos e repercute em funções sistêmicas.

Foram utilizados 178 ratos machos Wistar, sendo 54 jovens (J) e 124 adultos - maduros - (M), distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo 1 – controle, animais submetidos apenas a incisão e sutura escrotal.

Grupo 2 – animais submetidos a orquiepididimectomia total bilateral.

Após essas operações, foram realizados estudos que analisaram separadamente possíveis repercussões do hipogonadismo. No estudo A, foram medidos os níveis séricos de testosterona livre, o peso corpóreo e a espessura cortical da glândula adrenal de 30 ratos adultos. Os dados foram obtidos no trigésimo dia pós-operatório em dez ratos (Grupo 2i – imediato), e no oitavo mês pós-operatório de 20 ratos, sendo metade do Grupo 1 e metade do Grupo 2t (tardio).

No estudo B, os valores séricos de glicose, triglicérides, colesterol total e das frações HDL, LDL e VLDL foram medidos cinco meses após as operações em 40 ratos, distribuídos nos Grupos 1J (jovem, n = 10) e 1M (adulto, n = 10) – controle – e 2J (jovem, n = 10) e 2M (adulto, n = 10) – orquiectomizados.

No estudo C, avaliou-se a capacidade física, considerando o tempo de corrida máximo em esteira, no Grupo 1 (controle, n = 5) e no Grupo 2 (orquiectomizado, n = 11) cinco meses após as operações.

No estudo D, mediu-se a pressão da artéria caudal, por meio de pletismografia, de 12 animais adultos do Grupo 1 (controle) e 12 do Grupo 2 (orquiectomizado) no terceiro mês pós-operatório.

No estudo E, avaliou-se a função de órgãos do sistema mononuclear fagocitário no sétimo mês pós-operatório em 24 animais distribuídos nos grupos 1J (jovem, n = 6), 1M (adulto, n = 6) – controle – e 2J (jovem, n = 6) e 2M (adulto, n = 6) – orquiectomizado. Injetou-se enxofre coloidal marcado com $^{99}\text{Tc}^m$ e, após uma hora, foram colhidas amostras de fígado, baço, pulmão e coágulo sangüíneo. Em seguida, foi determinada a radioatividade de cada amostra.

No estudo F, mediu-se a resistência cicatricial cutânea no sexto mês pós-operatório em 44 ratos distribuídos nos grupos 1J (jovem, n = 11), 1M (adulto, n = 11) – controle – e 2J (jovem, n = 11) e 2M (adulto, n = 11) – orquiectomizados. Eles foram submetidos a incisão mediana no dorso e sutura das bordas da ferida. No 7º dia e no 21º dia após a realização dessa operação, retirou-se um fragmento de pele transversal à cicatriz contendo a cicatriz e a pele lateral a ela. Esse fragmento foi pinçado em suas extremidades e submetido a força de tração crescente. A resistência da cicatriz de cada fragmento foi medida de acordo com o valor da tração que provocou a sua ruptura.

Os resultados obtidos mostraram que a orquiepididimectomia total bilateral reduz os níveis séricos de testosterona nos ratos independentemente da idade do animal e, aparentemente, não altera a morfologia da glândula adrenal, tanto macro quanto microscópica. O hipogonadismo secundário a orquiepididimectomia total bilateral não modificou os valores séricos de glicose, do colesterol total e das frações LDL e HDL. Entretanto, a orquiectomia reduziu os níveis sangüíneos de triglicérides e de colesterol VLDL quando realizada em ratos

jovens. A deficiência de testosterona relacionou-se com menor ganho ponderal, aumento da pressão arterial, redução da resistência cicatricial cutânea em sua fase inicial. Não foi encontrada diferença na capacidade física do rato e na função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário após orquiectomia.

Portanto, a ausência de testosterona testicular, após orquiectomia bilateral, altera diversas funções orgânicas e acompanha-se de distúrbios sistêmicos.

2 ABSTRACT

This investigation belongs to a line of research, and its purpose was to evaluate the effects of hypogonadism secondary to orchiectomy on the organism of rats.

178 male Wistar rats were used. Of these, 54 were young (Y) and 124 were mature (M). These animals were divided into the following groups:

Group 1 – control, animals submitted only to incision and suture of the scrotum.

Group 2 – animals that underwent total bilateral orchiectomy.

After the surgeries, studies were conducted to analyze different repercussions of the hypogonadism. In study A, the serum levels of free testosterone, body weight and cortical size of the adrenal gland of 30 adult rats were measured. The data was obtained on the 30th postoperative day from 10 rats (Group 2i – immediate) and in the 8th postoperative month. The 20 rats, of this study, were divided into Group 1 (n = 10) and Group 2l – late (n = 10).

In study B, the serum levels of glucose, triglycerides, total cholesterol and the HDL, LDL and VLDL fractions were measured five months after the surgeries in 40 rats. These animals were divided into Group 1Y (young, n = 10) and Group 1M (mature, n = 10) – control – and Group 2Y (young, n = 10) and Group 2M (mature, n = 10) – submitted to bilateral orchiectomy.

In study C, the physical capacity was evaluated based on the maximum running time on a treadmill during the 5th postoperative month in Group 1 (control, n = 5) and Group 2 (submitted to orchiectomy, n = 11).

In study D, the pressure of caudal arteries assessed on 12 adult animals from Group 1 (control) and 12 adult animals from Group 2 (submitted to orchiectomy) was measured by a pletysmograph in the 3rd postoperative month.

In study E, the function of the organs of the mononuclear phagocyte system was evaluated in the 7th postoperative month. 24 animals were divided into Groups 1Y (young, n = 6), 1M (mature, n = 6) – control – and 2Y (young, n = 6) and 2M (mature, n = 6) – submitted to orchiectomy. Sulfur colloid complexed with ⁹⁹Tc^m was injected and after one hour, samples were collected from the liver, spleen, lung and blood clots. The radioactivity of each sample was assessed.

In study F, the resistance of scar tissue was measured in the 6th postoperative month. 44 rats were divided into Groups 1Y (young, n = 11), 1M (mature, n = 11) – control – and 2Y (young, n = 11) and 2M (mature, n = 11) – submitted to orchiectomy. They underwent a median incision on the dorsum followed by suture of the surgical wound. On the 7th and 21st postoperative days after the surgical procedure, a fragment of skin, including a portion of the scar and the healthy skin of both sides, was removed. The extremities of this fragment were grasped and the sample was then submitted to increasing traction. The resistance of the scar of each fragment was measured according to the traction value that provoked its rupture.

The results revealed that total bilateral orchiectomy reduces the serum level of testosterone in rats regardless of the age and, apparently, does not alter the micro or macroscopic morphology of the adrenal gland. Hypogonadism secondary to total bilateral orchiectomy does not alter the serum levels of glucose, total cholesterol, HDL and LDL fractions. However, bilateral orchiectomy reduces the serum levels of triglycerides and VLDL cholesterol in young male rats.

Testosterone deficiency is related to lower weight gain, increasing in blood pressure, reduction of initial phase of scar resistance. Orchiectomy did not affect the physical capacity of the rat and phagocyte function of the mononuclear phagocyte system.

Therefore, the absence of testicular testosterone due to bilateral orchiectomy is followed by organical alterations and causes systemic functional disturbances.

3 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional brasileiro cria desafios a serem enfrentados, especialmente relacionados aos idosos.¹ Diminuição da capacidade de trabalho, aumento da dependência física, acréscimo do risco de distúrbios cardiovasculares, alterações do peso podem ser provocados pelo hipogonadismo. Os custos sociais e individuais da deficiência androgênica podem ser melhor solucionados com a compreensão de seus efeitos no organismo. Mesmo após a produção da testosterona sintética na década de 1930, por Adolf Friedrich Johann Butenandt, e a indicação da orquiectomia terapêutica para neoplasia maligna da próstata, por Charles Brenton Huggins em 1941, ainda existem lacunas no conhecimento desse assunto.²⁻⁴

A castração reduz os níveis séricos de testosterona, mas é importante esclarecer de que maneira as glândulas adrenais, produtoras secundárias desse hormônio, reagem ao hipoandrogenismo e qual é a influência do eixo hipotálamo-hipofisário na produção de testosterona. Para isso, deve-se avaliar a camada cortical dessa glândula em relação aos níveis séricos de testosterona após castração.^{5, 6}

A testosterona também desempenha importante papel anabólico no organismo. Sua deficiência poderia modificar o peso corpóreo, a massa muscular e até mesmo a regeneração celular. É pertinente conhecer a capacidade física aeróbica, bem como a resistência cicatricial cutânea em hipogonadismo.^{6, 7}

A associação entre a testosterona e as medidas de pressão arterial, de glicemia e de lipídios plasmáticos ainda não foi totalmente estabelecida. As

conseqüências da hipertensão arterial, do diabetes melito e da dislipidemia justificam sua investigação.⁸⁻¹⁶

O organismo do idoso está sujeito a maior incidência de infecções, condição essa que é multifatorial. Como parte de uma linha de pesquisa, estudou-se a deficiência de testosterona e sua repercussão na função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário. O presente trabalho reuniu estudos de repercussões orgânicas da orquiectomia bilateral, em modelo experimental.^{17 - 34}

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na década de 1930, Huggins estudou os efeitos dos hormônios androgênicos no sistema urogenital masculino. Esse pesquisador foi o primeiro a reconhecer que o bloqueio androgênico induz à regressão de células neoplásicas da próstata. Já em 1941, ele obteve a remissão do câncer prostático avançado em pacientes que foram castrados.^{3, 4}

4.1 Deficiência Androgênica

Os testículos produzem continuamente testosterona da puberdade até o fim da vida. Essa produção diminui a partir dos 40 anos de idade e pode atingir níveis abaixo da normalidade e causar a condição clínica da deficiência androgênica do envelhecimento masculino (DAEM). Esse quadro manifesta-se por alterações do humor, redução da atividade intelectual, diminuição da libido e da qualidade das ereções, depressão, além de diminuição da massa e da força muscular. A literatura ainda é controversa quanto à reposição androgênica em todos os homens com redução de testosterona.^{5, 35, 36}

A orquiectomia bilateral reduz abruptamente os níveis de testosterona circulante, sendo por isso uma opção no tratamento do adenocarcinoma avançado de próstata. Outras indicações de orquiectomia são trauma testicular grave, neoplasia testicular e epididimal, torção testicular prolongada e orquite séptica grave e refratária a tratamento conservador.^{37 - 41}

4.2 Testosterona e Espessura Supra-Renal

Aproximadamente 98 % da testosterona circulante está ligada a proteínas plasmáticas, sendo que 60 % está unida a uma glicoproteína hepática, chamada globulina ligadora de hormônios sexuais ou SHBG (*sex hormone binding globulin*) e 38 % está ligada a albumina, para tornar-se disponível quando necessária. A atividade biológica é realizada pelos 2% de testosterona-livre. A enzima 5-alfa redutase, presente nos testículos, metaboliza a testosterona para diidrotestosterona, que é o andrógeno ativo nos tecidos.³⁵ A testosterona também pode ser aromatizada e transformar-se em estradiol, que é outro metabólito ativo.⁸

Em homens, as células de Leydig testiculares secretam mais de 95 % do total da testosterona circulante, sendo o restante produzido pelas zonas fasciculada e reticulada das glândulas supra-renais.¹⁰³ Casquero sugeriu que em camundongos após a castração não havia quantidade suficiente de andrógenos na circulação para desempenhar as funções desse hormônio.⁴³

O hormônio hipotalâmico de liberação de gonadotropinas (GnRH) atua em receptor específico na membrana das células gonadotróficas da hipófise e estimula a liberação de hormônio luteinizante - LH - e hormônio folículo estimulante - FSH - que regulam o crescimento testicular, a espermatogênese e a esteroidogênese. O papel principal do LH é estimular as células de Leydig a produzirem testosterona. A secreção de hormônio luteinizante é controlada pela retroalimentação negativa dos esteróides gonadais no hipotálamo e na hipófise. Tanto a testosterona quanto o estradiol provocam essa inibição.⁴⁴

4.3 Lipidograma

O colesterol, dentro das células de Leydig, é o precursor dos hormônios sexuais e o principal substrato para a síntese de testosterona. Durante a adolescência, diminuem os níveis das frações de colesterol HDL (*high density lipoprotein*) e LDL (*low density lipoprotein*). Os níveis de HDL estão inversamente relacionados com a testosterona em meninos púberes. Essas mudanças durante a maturação sexual indicam que os hormônios sexuais participam do metabolismo das lipoproteínas.^{13, 43}

Alguns autores relataram aumento da fração LDL em situações de deficiência de testosterona em diferentes espécies, inclusive em seres humanos hipogonádicos.^{46, 47} Diminuição do HDL foi observada em estudos realizados em homens hipogonádicos e em camundongos castrados.^{10, 48, 49}

Por outro lado, aumento ou ausência de variação nos níveis de HDL também ocorreu em homens com deficiência de testosterona, em macacos e em camundongos castrados.^{8, 46, 50 - 52}

4.4 Cicatrização e Glicemia

A cicatrização de feridas pode ser prejudicada por diversas condições, como hiperglicemia, hipoproteinemia, infecção e alterações na síntese do colágeno. Hormônios androgênicos causam balanço nitrogenado positivo e aumentam a síntese de proteínas. Devido ao efeito anabólico desses hormônios, sua utilização foi proposta para acelerar a cicatrização de feridas. Vários estudos mostraram que as feridas são sensíveis a estímulos andrógenos e que sua deficiência resulta em cicatrização anômala.^{53 - 55} A atividade pró-mitótica desses mediadores, em concentrações fisiológicas, parece estimular a produção de

tecido de granulação em feridas. Em contrapartida, doses elevadas de testosterona têm efeito inibitório no tecido de granulação.⁵⁶

4.5 Peso e Pressão Arterial

A diminuição acentuada dos níveis séricos de testosterona implica em várias alterações na composição corporal, como diminuição da massa muscular e aumento da massa gordurosa. O hipogonadismo é considerado também um fator de risco para algumas doenças, como osteoporose, osteopenia, hipertrigliceridemia, obesidade e hipertensão arterial.^{57 - 59}

Estudos em animais mostraram que a testosterona possui uma ação vasodilatadora coronariana, na aorta torácica, na vasculatura pulmonar e em veias mesentéricas isoladas.^{60 - 67} A testosterona não induz somente vasodilatação pela liberação de óxido nítrico, mas claramente atua na melhora da sensibilidade da musculatura vascular lisa à ação dessa molécula.⁶⁴

4.6 Capacidade Física

Os músculos esqueléticos de mamíferos são compostos por diferentes fibras que podem alterar seu fenótipo, em decorrência de fatores como desnervação, reinervação, exercício físico, envelhecimento e hormônios.⁷ Alguns trabalhos verificaram que a testosterona aumenta a massa e a força dos músculos.^{68 - 71} Já Isayama não encontrou grandes diferenças nas distribuições dos tipos de fibras em músculos esqueléticos de ratos, sendo que apenas a área de secção transversal de alguns tipos de fibras sofre mudanças.⁷

4.7 Sistema Mononuclear Fagocitário

A maturação do organismo masculino depende da presença de testosterona ainda na infância, para desenvolver as características masculinas. Dessa forma, alguns autores sugerem que a testosterona pode influenciar no amadurecimento do sistema de defesa do organismo ou até mesmo participar de sua função fagocitária.^{72, 73} Azevedo, em 1997, encontrou redução da capacidade proliferativa de linfócitos após orquiectomia em rato. Esse quadro revertia após o tratamento com testosterona.⁷² Braude *et al* perceberam resposta imunológica diferente entre os sexos, possivelmente relacionada à testosterona.⁷⁴

5 OBJETIVOS

Verificar se a castração em ratos modifica os níveis de testosterona e os aspectos morfológicos da glândula adrenal.

Em animais com hipogonadismo secundário a orquiepididimectomia total bilateral, estudar modificações no lipidograma e na glicemia.

Investigar se a deficiência de testosterona provoca alterações:

- no peso corpóreo,
- na capacidade física aeróbica,
- na pressão arterial,
- na função fagocitária de órgãos do sistema mononuclear fagocitário,
- na resistência cicatricial cutânea.

6 MÉTODO

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA).^{75, 76}

6.1 Animais Utilizados e Cuidados Gerais

Foram utilizados 178 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos da linhagem Wistar, sendo 54 jovens, com trinta dias de vida, e 124 adultos, com idade superior a três meses. Eles eram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e foram transferidos para o Biotério Central da Faculdade de Medicina da UFMG.

Os animais foram alocados em gaiolas apropriadas com até quatro ratos por gaiola e mantidos em condições de temperatura ambiente com luminosidade natural, obedecendo ao ciclo circadiano murino descrito na literatura, com 12 horas de luz e 12 horas de escuridão.^{30, 77} Eles foram acompanhados diariamente e receberam água e ração à vontade, sem adição de suplemento protéico, calórico ou lipídico de qualquer natureza durante todo o período da pesquisa.

Para a avaliação ponderal dos animais, foi utilizada uma balança eletrônica de precisão (Marte®, modelo AS500), cuja carga máxima era de 500 g e sensibilidade de 0,01 g.

6.2 Distribuição dos Animais

De acordo com a idade, os ratos foram designados com a letra J para animais jovens (30 dias de vida) e letra M para ratos maduros – adultos – (com mais de três meses de vida). Eles foram aleatoriamente distribuídos em grupos de acordo com o procedimento operatório realizado:

Grupo 1: controle, submetidos a operação simulada sem orquiectomia.

Grupo 2: submetidos a orquiepididimectomia total bilateral.

6.3 Técnica Anestésica e Cirúrgica

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas dependências do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG, obedecendo às normas técnicas de assepsia e anti-sepsia.

Todos os ratos foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina (Ketalar®, Pfizer, São Paulo), na dose de 50 mg/kg de peso corporal, e cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer, São Paulo), na dose de 5 mg/kg de peso corporal, por via intramuscular na região glútea direita.⁷⁸ Durante todo o período de anestesia, foram observadas as frequências cardíaca e respiratória, além da movimentação voluntária dos ratos, com vista a detectar o nível da anestesia e possíveis complicações anestésicas.

Os ratos foram imobilizados com esparadrapo sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito dorsal. As operações foram realizadas através de incisão mediana anterior do escroto, abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Em seguida, o procedimento dependeu do grupo ao qual o animal pertenceria. No Grupo 1, a pele do escroto era suturada com fio de catégute cromado 3-0 (Catgut chromic Polysuture®). No Grupo 2, os funículos

espermáticos foram ligados com fio de seda 3-0 (Ethicon – Johnson & Johnson) e seccionados. Os testículos e os epidídimos foram removidos e o escroto foi suturado com fio de catégute cromado 3-0 (Catgut chromic Polysuture®).

6.4 Estudos Realizados nos Animais Controle e Orquiectomizados

Após as operações os animais foram distribuídos em seis estudos diferentes, com vista a responder às questões do objetivo deste trabalho.

6.4.1 Estudo A: Peso dos animais, morfologia da glândula adrenal

Trinta ratos adultos foram distribuídos em três grupos:

Grupo 1 (n = 10) – controle.

Grupo 2i (n = 10) – orquiectomia, ratos mortos no trigésimo dia pós-operatório, que foi considerado como imediato (i).

Grupo 2t (n = 10) – orquiectomia, ratos mortos após oito meses da operação, no período considerado pós-operatório tardio (t).

Os animais dos Grupos 1 e 2t foram mortos oito meses após as operações, para medir o nível sérico de testosterona livre e avaliar as morfologias macro e microscópicas das glândulas adrenais. O peso de todos os ratos também foi medido.

Decorrido o período de acompanhamento de 30 dias ou oito meses, os ratos foram anestesiados, de acordo com o descrito no item 6.3 e pesados. No período da manhã, realizou-se laparotomia mediana, por planos e foram colhidos 5 ml de sangue da veia cava caudal para dosar os níveis de testosterona livre. Em seguida, as glândulas adrenais foram retiradas com muito cuidado para evitar

traumatizá-las. Os animais foram mortos com aprofundamento da anestesia (item 6.3).

A testosterona foi processada por ensaio competitivo. Esse hormônio, atuando como antígeno, reage de forma competitiva com antígenos semelhantes dos *kits* reagentes marcados com substância fluorescente. Houve, portanto, uma competição entre esse antígeno pela ligação com os anticorpos policlonais de coelhos, da classe IgG, difusos na fase sólida. Essa ligação foi diretamente proporcional à concentração inicial de cada antígeno. Na etapa seguinte, o excesso de sobrenadante foi removido, permanecendo apenas os anticorpos ligados à fase sólida. Posteriormente, um segundo anticorpo de coelho da classe IgG, contra o anticorpo da fase sólida, foi acrescentado à reação e, ao ligar-se, liberou o antígeno marcado. No processo final, mediu-se a fluorescência desses antígenos residuais marcados e liberados. A intensidade de fluorescência obtida foi inversamente proporcional à concentração dos hormônios em análise.

As glândulas retiradas foram cuidadosamente manipuladas e fixadas em solução de formaldeído a 4%. Numa segunda etapa, elas foram desidratadas com imersão em soluções de etanol em água (concentração crescente de 70% até 100%) seguida por banho em xilol. Depois, foram incluídas em blocos de parafina histológica (Histosec®), previamente derretida em uma estufa à temperatura aproximada de 60°C. O tecido incluído nesses blocos foi seccionado longitudinalmente ao longo do seu maior eixo, em cortes com 4 µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo (LEICA®, modelo RM2125, Germany). Os cortes foram fixados sobre lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE), para avaliar as características gerais da glândula e estabelecer o limite entre as camadas cortical e medular. A espessura da camada cortical foi medida com o

auxílio de uma lente com régua de 1 centímetro graduada em décimos de milímetros, acoplada na ocular esquerda de microscópio óptico (Nikon®) sob aumento de 40 vezes.

Sob visão a olho nu, a régua mede 10 mm. Ao ser acoplada sob a ocular, a imagem obtida da própria régua sofre um aumento de 10 vezes e passa a medir 100 mm transformando sua graduação de décimo de milímetros para milímetros. O tecido, por sua vez, está sob aumento de 40 vezes (10 X da ocular e 4 X da objetiva). Desse modo, a medida em milímetros encontrada sob microscopia deve ser dividida por 40 para se obter a medida real em milímetros. Por exemplo, uma medida de 28 mm ao microscópio corresponde a 0,70 mm. Esse aumento permite distinção satisfatória entre as camadas medular e cortical da glândula, bem como magnificação adequada da régua.

Durante o exame microscópico, a adrenal foi dividida em quatro quadrantes e em cada um deles foi considerada a maior medida da camada cortical. Essas quatro medidas de cada glândula foram registradas para a análise estatística.

6.4.1.1 Estatística

As medidas coletadas foram submetidas ao teste Kolmogorov-Smirnov (KS), para determinar a distribuição gaussiana dos dados, e ao teste de Bartlett para encontrar as variâncias. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA). Nos resultados em que a diferença foi significativa, utilizou-se o pós-teste de comparação múltipla de Tukey, para definir quais grupos foram diferentes. O nível de significância correspondeu a $p < 0,05$.

6.4.2 Estudo B: Avaliação da glicemia e do lipidograma

40 ratos, jovens (J) e maduros (M), foram distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo 1 J (n = 10) – controle, ratos jovens.

Grupo 1 M (n = 10) – controle, ratos adultos.

Grupo 2 J (n = 10) – orquiectomia, ratos jovens.

Grupo 2 M (n = 10) – orquiectomia, ratos adultos.

Foi colhido sangue de todos os animais, para dosagem da glicemia, do colesterol total e de suas frações, bem como dos triglicérides, cinco meses após as operações.

Todos os ratos jovens estavam com 30 dias de vida (peso entre 55 e 80 gramas) na época da orquiectomia. Já os adultos tinham 3 a 4 meses de idade e peso entre 250 e 350 gramas.

A coleta sangüínea ocorreu com o animal anestesiado, de acordo com o descrito no item 6.3 e em decúbito dorsal. Foi dissecada a veia femoral direita e realizada punção em sistema a vácuo (Vacuntainer®, Becton Dickinson, Brasil), para retirada de 1 ml de sangue, em tubo estéril, com gel de separação e frasco revestido com papel alumínio, para proteção da luz.

As amostras foram imediatamente encaminhadas ao Setor de Bioquímica do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG. Os valores do colesterol total (CT) e da fração HDL, foram medidos assim como os dos triglicérides (TG), pelo método colorimétrico de química seca, no analisador bioquímico automático Vitros® 950 (Ortho-Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson, EUA). Os valores de colesterol VLDL e LDL foram calculados seguindo

a fórmula de Friedewald: $LDL = CT - HDL - TG/5$ e $VLDL = TG/5$. A glicemia foi medida pelo método colorimétrico (glicose-oxidase), com o mesmo aparelho.

6.4.2.1 Estatística

Os dados referentes à glicemia, ao colesterol total e suas frações e aos triglicérides, foram analisados estatisticamente em cada grupo pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (KS), para determinar a distribuição gaussiana dos dados e, em seguida, pelo teste de Bartlett, para encontrar as variâncias. Os dados que apresentaram a distribuição gaussiana e mesma variância eram submetidos a análise da variância (ANOVA) seguida de múltipla comparação por teste de Tukey.

6.4.3 Estudo C: Exercício físico e peso corporal

Foram utilizados 16 ratos adultos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar. Eles foram distribuídos em dois grupos:

Grupo 1 (n = 5) – controle.

Grupo 2 (n = 11) – orquiectomia.

Os animais foram pesados no pré-operatório imediato e, semanalmente, nos dois meses seguintes a orquiectomia.

Decorridos cinco meses da operação, todos os animais foram treinados para correr sobre uma esteira rolante (Modular Treadmill, Columbus Instruments, USA) a uma velocidade constante de 14 metros por minuto, sem inclinação da esteira, durante quatro dias consecutivos, por cinco minutos em cada dia (Figura 1).

Antes de iniciar o exercício definitivo, os animais foram pesados novamente. Para testar a capacidade física, os ratos correram sobre a esteira

rolante, a uma velocidade constante de 20 m/min, sem inclinação da esteira, até a fadiga. Mediu-se o tempo total da corrida, em minutos. O teste era interrompido quando o animal não conseguia manter-se correndo à velocidade estipulada e passava a cair repetidamente ou permanecia mais de 10 segundos fora da esteira. O número de quedas do animal e o tempo que ele permanecia sem querer correr foram determinados por observação direta.⁷⁹

6.4.3.1 Estatística

Os resultados foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para comparar as amostras independentes em relação à variável de interesse. Considerou-se significativa a diferença correspondente a $p < 0,05$.

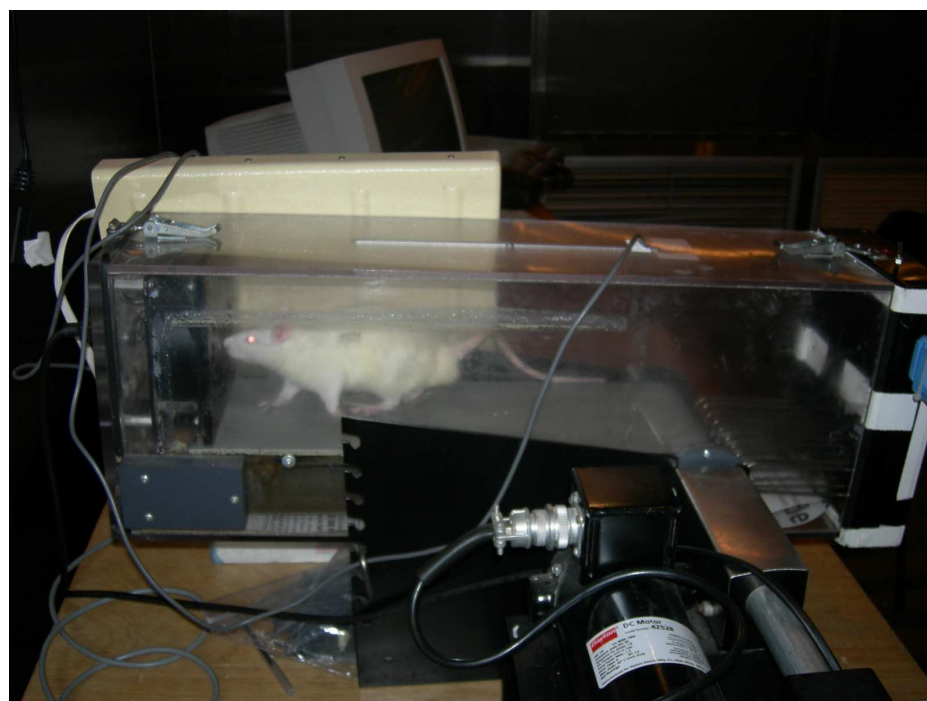


FIGURA 1 - Rato durante a corrida sobre uma esteira (Rato 1 do Grupo-controle).

6.4.4 Estudo D: Pressão arterial

Foram utilizados 24 ratos adultos, distribuídos nos grupos:

Grupo 1 (n = 12) – controle.

Grupo 2 (n = 12) – orquiectomia.

Foram medidas as pressões dos animais antes das operações e no terceiro mês pós-operatório, em ambos os grupos.

A pletismografia mostra alterações de volume decorrentes do obstáculo venoso. Esse exame consiste na aplicação de um manguito proximal na cauda do rato e outro distal, que funciona como um sensor (Figura 2). O primeiro manguito é insuflado, para ocluir o retorno venoso, correspondendo à coluna de mercúrio (escala em milímetros). O manguito proximal é esvaziado e o sensor distal registra as oscilações de volume, que se refletem na coluna de água. A oscilação do sensor de água tem início quando a pressão do manguito de mercúrio diminui até o valor igual à pressão arterial sistólica, pela deformação da parede arterial, já que não ocorre retorno venoso. A medida que se reduz a pressão do manguito de mercúrio, as oscilações do sensor aumentam de amplitude até a pressão arterial média, na qual a oscilação da coluna de água é máxima. O método requer o pré-aquecimento do animal, para aumentar o fluxo sanguíneo da cauda e tornar as oscilações nítidas.

As medidas de pressão foram iniciadas com insuflação manual do manguito de mercúrio até 200 milímetros de altura. Procedeu-se à abertura mínima da válvula do manômetro, para uma lenta redução da coluna de mercúrio, até atingir a pressão arterial média da cauda. O procedimento durou em torno de 15 segundos.

Esse exame ocorreu em ambiente tranqüilo e após adaptação do animal ao método. Treinamento foi necessário para reduzir a variabilidade das medidas da pressão arterial e consistiu de duas sessões diárias durante três dias, com técnica idêntica à do procedimento definitivo.⁸⁰ Cada sessão obedeceu à mesma rotina de aquecer o rato durante 10 minutos em uma caixa de madeira à temperatura aproximada de 33°C a 34°C. Em seguida, o animal era delicadamente conduzido a um recipiente tubular com as seguintes características: 30 cm comprimento, 10 cm ou 15 cm de diâmetro, conforme tamanho do rato, e extremidade anterior móvel, para contenção do animal. Na parte de trás, o recipiente era fenestrado, para exteriorização da cauda do animal, que era conectadas ao pletismógrafo. No quarto dia, foram feitas as medidas definitivas de pressão. A movimentação excessiva do rato, que não se posicionava adequadamente para as medidas, invalidaram seus resultados, e o animal era excluído deste estudo.⁸¹

6.4.4.1 Estatística

O teste de Wilcoxon analisou as medidas de pressão pré- e pós-operatórias no Grupo 2. Os resultados pós-operatórios dos grupos 1 e 2 foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância considerado correspondeu ao valor de $p < 0,05$.

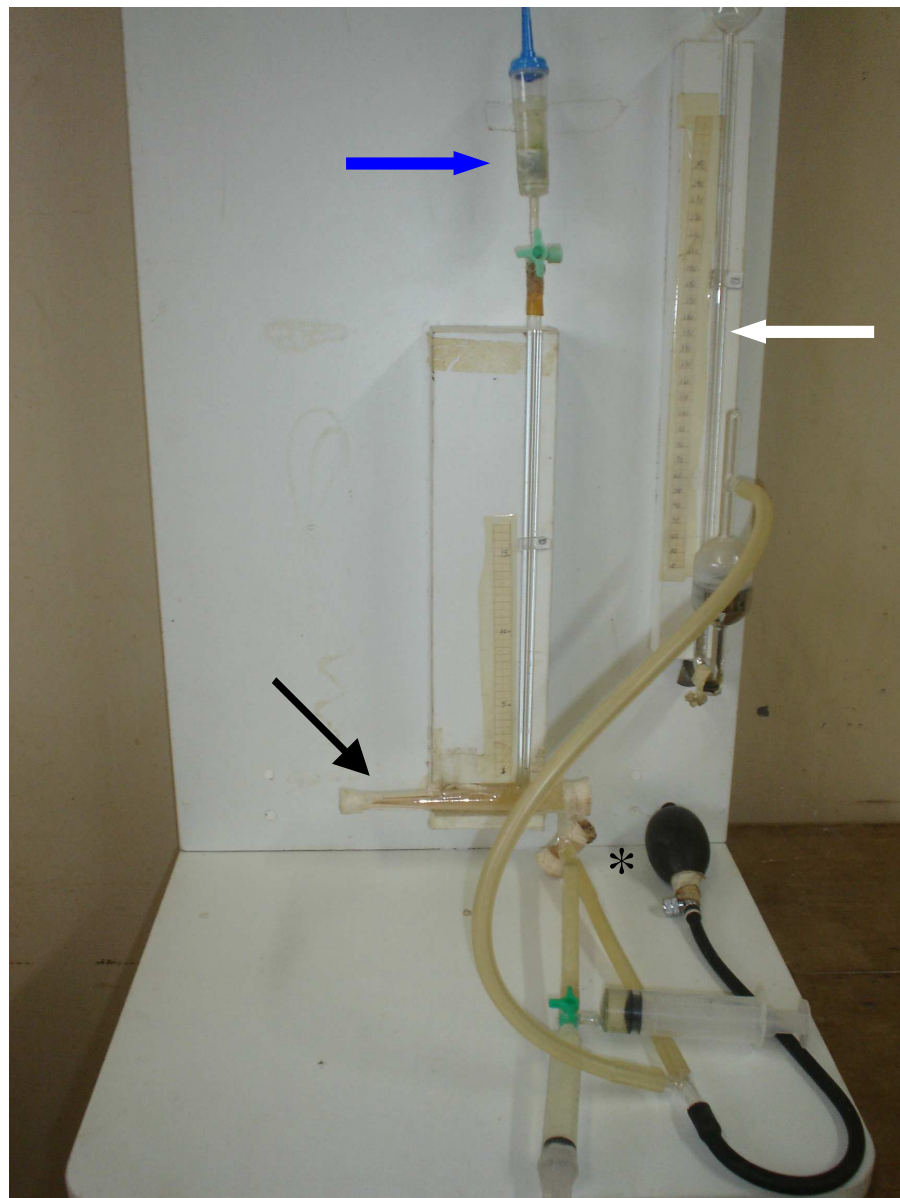


FIGURA 2 - Pletismógrafo para avaliar a pressão da artéria caudal do rato.

- Manguito distal (sensor) (seta preta).
- Manguito proximal que comprime a cauda (*).
- Colunas de água (seta azul) e de mercúrio (seta branca).

6.4.5 Estudo E: Função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário

Vinte e quatro ratos, 12 jovens (J) e 12 adultos (M), foram distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo 1 J (n = 6) – controle, ratos jovens.

Grupo 1 M (n = 6) – controle, ratos adultos.

Grupo 2 J (n = 6) – orquiectomia, ratos jovens.

Grupo 2 M (n = 6) – orquiectomia, ratos adultos.

Após sete meses das operações, a média dos pesos foi de 368 ± 28 gramas entre os jovens e de 391 ± 90 gramas entre os adultos.

Exclusivamente nesta etapa do Estudo E, a anti-sepsia não foi realizada com solução iodada (PVPI degermante®), para evitar a reação do iodo com os íons Sn^{2+} e interferência na marcação do radiofármaco.⁸²

Mediante a anestesia descrita no item 6.3 e dissecação da veia femoral, os animais receberam injeção de 0,1 ml de enxofre coloidal marcado com $^{99}\text{Tc}^m$. Após uma hora, os ratos foram mortos com aprofundamento da anestesia já descrita, na mesma seqüência que receberam os radiofármacos. Amostras de fígado, baço, pulmão e coágulo de sangue foram colhidas, devidamente identificadas e colocadas em pequenos copos de plástico.

A radioatividade foi medida colocando os copos com as amostras no receptáculo de um colimador tipo *pin hole* de um aparelho de gama-câmara, (Siemens, modelo Orbiter, USA). A radioatividade foi determinada por grama de tecido. A somatória da radioatividade que todas as amostras emitiram, recebeu o valor 100. Com base nesse valor, a radioatividade de cada tecido específico (fígado, baço, pulmão e sangue) foi determinada em valores percentuais.

6.4.5.1 Estatística

O teste t de Student foi utilizado a fim de comparar os valores obtidos entre os grupos 1J e 2J e entre 1M e 2M, para cada tecido. A somatória dos resultados do fígado, baço, pulmão e coágulo foram comparados pelo teste de Friedman seguido pelo teste de Wilcoxon dois a dois entre as amostras de cada órgão ou coágulo. O nível de significância considerado correspondeu a $p < 0,05$.

6.4.6 Estudo F: Resistência cicatricial cutânea

Foram utilizados 44 ratos distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo 1 J (n = 11) – controle, ratos jovens.

Grupo 1 M (n = 11) – controle, ratos adultos.

Grupo 2 J (n = 11) – orquiectomia, ratos jovens.

Grupo 2 M (n = 11) – orquiectomia, ratos adultos.

Todos os ratos jovens estavam com 30 dias de vida (peso entre 55 e 80 gramas) na época da orquiectomia. Já os adultos tinham 3 a 4 meses de idade e peso entre 250 e 350 gramas.

Seis meses após a orquiectomia, todos os animais foram novamente pesados e, sob a anestesia descrita no item 6.3, eles foram submetidos a incisão mediana no dorso, atingindo todos os planos da pele e subcutâneo, até a fáscia muscular, numa extensão de 3 cm de comprimento. Em seguida, as bordas da ferida foram suturadas com quatro pontos simples, utilizando náilon 4-0 (Nylon®, Ethicon, São Paulo).

No 7º dia e no 21º dia após a realização das incisões, retirou-se um fragmento de pele transversal à cicatriz, medindo 4 cm X 1 cm, contendo a cicatriz em sua parte média. Os pontos da pele foram cuidadosamente removidos do

fragmento, que foi pinçado em suas extremidades por duas pinças de Duval de 22 cm. A medida do segmento de tecido entre as pinças foi de 1 cm X 1 cm. Uma pinça foi presa a um suporte metálico, enquanto a outra foi amarrada à alça de um frasco de plástico. Um filete de água destilada a uma velocidade de 650 ml/min foi enchendo o frasco até a ruptura do segmento. Mediu-se o volume do líquido, transformando-o em gramas, que foi somado ao peso do frasco, ao do barbante e ao da pinça inferior a ele (Figura 3). A resistência cicatricial foi medida em grama/cm², que representa o peso suficiente para causar ruptura de 1 cm² de tecido contendo a cicatriz.

O restante da cicatriz foi retirado e corado com HE de acordo com o método descrito no item 6.4.1. Pesquisaram-se a presença de tecido de granulação e neoformação fibrosa cicatricial.

6.4.6.1 Estatística

Os resultados das tensões cicatriciais foram considerados como medidas não paramétricas e comparados por meio do teste de Mann-Whitney. Foram consideradas significativas as diferenças correspondentes a $p < 0,05$.



FIGURA 3 - Equipamento utilizado para o teste de resistência cicatricial.

- Frasco-depósito com torneira (*).
- Segmento de pele contendo a cicatriz (seta) suspenso entre duas pinças de Duval.
- Frasco de plástico suspenso pela pinça inferior por meio de um barbante.

7 RESULTADOS

7.1 Avaliação dos Resultados Obtidos em Cada Etapa do Estudo

Todos os animais foram mortos ao final do estudo e os dados obtidos foram agrupados conforme as etapas da pesquisa.

7.1.1 Estudo A: Peso dos animais, morfologia da glândula adrenal

Um animal adulto não orquiectomizado (Grupo 1) foi excluído da análise devido a falha no processamento da amostra sanguínea para dosagem da testosterona.

No Grupo 2t houve menor ganho ponderal que no controle (Tabela 1). Os ratos do Grupo 2i, mortos um mês após a orquiectomia, apresentaram o menor peso dentre os três grupos, porém deve-se considerar que morreram em idade mais jovem, portanto não podem ser comparados com os outros dois grupos.

A Tabela 1 mostra níveis séricos de testosterona livre menores nos ratos orquiectomizados em relação aos do controle. Não houve diferença entre os Grupos 2i e 2t ($p = 0,41$).

A orquiectomia não modificou o padrão histológico das camadas adrenais, medular e cortical, conforme a preparação histológica utilizada, hematoxilina e eosina. Quanto à espessura do córtex adrenal (Figura 4), a análise de variância não encontrou diferença entre os grupos ($p = 0,54$).

Tabela 1 - Valores (média \pm desvio-padrão da média) do peso corporal, da testosterona livre e da espessura da glândula adrenal de ratos dos Grupos 1, 2i e 2t

	Peso (g)	Testosterona livre (pg/ml)	Espessura adrenal (mm)
Grupo 1 (n = 9)	546 \pm 37	2132 \pm 948 **	0,67 \pm 0,06
Grupo 2 i (n = 10)	315 \pm 15	136 \pm 39	0,70 \pm 0,08
Grupo 2 t (n = 10)	452 \pm 21 *	87 \pm 14	0,71 \pm 0,06

Grupo 1 (controle): ratos mortos após 8 meses.

Grupo 2 (inicial): orquiectomia, ratos mortos após 30 dias.

Grupo 2 (tardio): orquiectomia, ratos mortos após 8 meses.

*: diferente da média do Grupo 1 (controle) ($p < 0,001$).

** : diferente da média dos demais grupos ($p < 0,0001$).

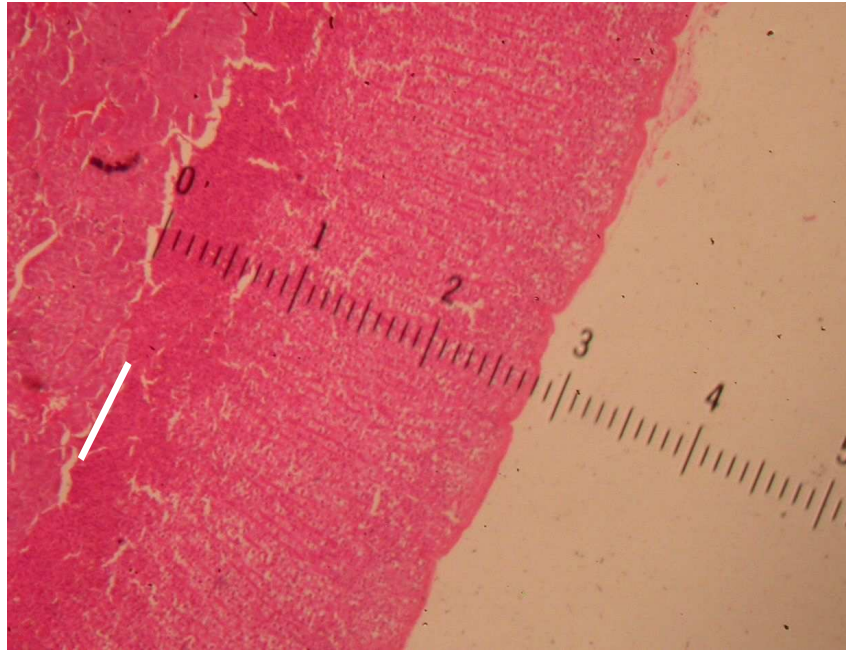


FIGURA 4 - Medida da espessura cortical da glândula adrenal, com régua graduada em milímetros.

- A linha branca delimita a transição entre a medula e o córtex.
- (Rato 3 do Grupo-controle, HE, 40X)

7.1.2 Estudo B: Avaliação da glicemia e do lipidograma

Foram excluídos da análise dois animais adultos não orquiectomizados (Grupo 1M), devido à falha no processamento de amostra sanguínea, por hemólise.

A orquiectomia não modificou os níveis séricos de glicose, do colesterol total e das frações LDL e HDL ($p > 0,05$ em todas as comparações). Entretanto, a orquiectomia, quando realizada em ratos jovens, reduziu os níveis sanguíneos de triglicérides e de colesterol VLDL (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores (média \pm desvio-padrão da média, mg/dl) de exames bioquímicos do sangue de ratos colhidos 5 meses após as operações

Grupo	Glicose	Colesterol				Triglicérides
		Total	HDL	LDL	VLDL	
1 J	125 \pm 33	81 \pm 12	25 \pm 4,5	43 \pm 8	12 \pm 3	62 \pm 16
1 M	149 \pm 25	77 \pm 10	22 \pm 4,9	42 \pm 6	12 \pm 4	63 \pm 24
2 J	141 \pm 27	86 \pm 15	26 \pm 4,7	51 \pm 10	8 \pm 1,5*	44 \pm 7**
2 M	130 \pm 15	79,9 \pm 11	23 \pm 3,7	45 \pm 10	11 \pm 3	57 \pm 15

Grupo 1 J (jovem): n = 10, controle, ratos jovens.

Grupo 1 M (adulto): n = 8, controle, ratos adultos.

Grupo 2 J (jovem): n = 10, orquiectomia, ratos jovens.

Grupo 2 M (adulto): n = 10, orquiectomia, ratos adultos.

*: diferente da média em relação ao Grupo 1J (p = 0,005).

** : diferente da média em relação ao Grupo 1J (p = 0,005).

HDL (*high density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*), VLDL (*very low density lipoprotein*).

7.1.3 Estudo C: Exercício físico e peso corporal

Os resultados do peso e do tempo de corrida do Grupo 1 apresentaram desvios-padrão menores que o Grupo 2, o que corrobora com a validade do número amostral nesse grupo. Os resultados na Tabela 3 revelam que não houve diferença entre os pesos (p = 0,2573) e o tempo corrida (p = 0,1405) entre os grupos pesquisados, apesar de a média dos pesos dos ratos orquiectomizados ter sido maior do que a encontrada no controle.

Tabela 3 – Valores (média \pm desvio padrão) de peso e tempo de corrida de ratos dos Grupos 1 e 2, cinco meses após as operações

	Peso (g)*	Tempo (min)*
Grupo 1 (n = 5)	327,1 \pm 25,4	81,6 \pm 40,3
Grupo 2 (n = 11)	359,6 \pm 38,2	100,9 \pm 44,2

Grupo 1: controle e Grupo 2: orquiectomia.

*: sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$).

7.1.4 Estudo D: Pressão arterial

Foram excluídos dois animais do Grupo 2 por dificuldade técnica na realização das medidas de pressão. Esses ratos não se adaptaram ao método e ficaram inquietos no recipiente.

Os animais orquiectomizados apresentaram pressão arterial maior do que os do controle. Houve aumento da pressão arterial no pós-operatório em relação ao pré-operatório nos ratos do Grupo 2 (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores (média \pm desvio-padrão da média) da pressão arterial média (mmHg) da cauda de ratos dos grupos 1 e 2

	Pré-operatório	Pós-operatório
Todos os ratos	104.0 \pm 2,9	
Grupo 1 (n = 12)		107.8 \pm 3.4*
Grupo 2 (n = 10)		121.1 \pm 6,4**

Grupo 1: controle e Grupo 2: orquiectomia.

*: diferente do Grupo 2 ($p = 0,0348$).

** : diferente do pré-operatório ($p = 0,016$).

7.1.5 Estudo E: Função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário

Excluiu-se da análise um animal orquiectomizado jovem, devido a falha na injeção de tecnécio.

A média das porcentagens de cada tecido (fígado, baço e pulmão) e do coágulo sanguíneo estão apresentados na Tabela 5. O fígado foi o órgão que, proporcionalmente, mais captou o colóide radioativo, seguido pelo baço, depois pulmão. Por último, verificaram-se traços de radiofármaco no coágulo sanguíneo.

A orquiectomia não parece ter influenciado na distribuição de radioatividade nas amostras estudadas. Desse modo, os animais do Grupo – controle e dos orquiectomizados mostraram um padrão distributivo semelhante na função fagocitária do SMF.

Tabela 5 - Comparação (média \pm desvio-padrão da média) dos valores percentuais de radiação em cada grupo entre animais orquiectomizados (Grupo 2) e controle (Grupo 1) de ratos jovens (J) e adultos (M)

Grupos	Órgãos			Coágulo sangüíneo
	Fígado	Baço	Pulmão	
1 J (n = 6)	50,45 \pm 8,63	35,48 \pm 9,22	9,93 \pm 6,80	4,13 \pm 2,50
1 M (n = 6)	51,40 \pm 10,95	35,36 \pm 7,94	7,83 \pm 3,83	5,40 \pm 4,09
2 J (n = 5)	52,62 \pm 3,90	32,64 \pm 8,42	9,02 \pm 5,76	5,72 \pm 3,49
2 M (n = 6)	53,55 \pm 12,06	33,21 \pm 10,08	7,08 \pm 4,73	6,15 \pm 5,08

O teste t de Student encontrou valores de $p > 0,05$ em todas as comparações feitas entre os grupos 1J e 2J e entre 1M e 2M, para cada tecido analisado.

Os testes de Friedman e de Wilcoxon detectaram $p = 0,0001$ para a comparação entre os valores obtidos do fígado, baço, pulmão e coágulo.

7.1.6 Estudo F: Resistência cicatricial cutânea

As cicatrizes cutâneas não mostraram anormalidade à macroscopia. No sétimo dia pós-operatório, observou-se que a área cicatricial era mais tênue, enquanto, no 21^o dia, ela tornou-se firme. Não ocorreu infecção ou necrose.

Os resultados da resistência cicatricial estão na Tabela 6. A resistência cicatricial em ratos orquiectomizados jovens (Grupo 2J) foi menor que no Grupo-controle (Grupo 1J) após sete dias da incisão cutânea. Entretanto, não houve diferença entre os dois grupos após 21 dias. Também não se constatou diferença

entre os grupos 1M e 2M. A resistência da cicatriz após 21 dias foi maior do que a encontrada após sete dias, nos dois grupos ($p = 0,013$).

Na avaliação histológica do sétimo dia pós-operatório, houve pequeno aumento do colágeno e o infiltrado inflamatório era constituído por polimorfonucleares, plasmócitos, linfócitos e macrófagos, além de congestão vascular. Já no 21º dia, houve um padrão morfológico mais homogêneo, com melhor arranjo de fibroblastos e fibras colágenas, que se encontravam mais espessas e com distribuição paralela. Não foi encontrada diferença morfológica entre os grupos de mesmo período pós-operatório.

Tabela 6 – Resistência cicatricial (média \pm desvio padrão) (gramas/cm²) em pele de ratos no 7º dia e no 21º dia após incisão cutânea

Grupos	Dias após incisão no dorso	
	7	21**
1 J (n = 11)	503,6 \pm 167,8	1215,0 \pm 428,1
1 M (n = 10)	495,9 \pm 259,5	1126,7 \pm 297,8
2 J (n = 10)	419,6 \pm 135,6*	1216,4 \pm 287,3
2 M (n = 11)	532,6 \pm 278,1	1264,6 \pm 394,4

Grupo 1 J: n = 10, controle, ratos jovens.

Grupo 1 M: n = 10, controle, ratos adultos.

Grupo 2 J: n = 10, orquiectomia, ratos jovens.

Grupo 2 M: n = 10, orquiectomia, ratos adultos.

*: diferente da média em relação ao controle ($p = 0,038$)

** : resistência cicatricial maior que no 7º dia, em todos os ratos ($p = 0,013$).



FIGURA 5 - Corte histológico da cicatriz (*) cutânea do animal do Grupo–controle (Rato 4 do Grupo 1 M), no 21º dia pós-operatório (HE, 40X).



FIGURA 6 - Corte histológico da cicatriz (*) cutânea do animal orquiectomizado (Rato 7 do Grupo 2 M), no 21º dia pós-operatório (HE, 40X).

8 DISCUSSÃO

Ao descobrir a dependência hormonal de células prostáticas, Huggins em 1966, recebeu o prêmio Nobel em Medicina e deixou um legado para pesquisa acerca das repercussões sistêmicas da orquiectomia.^{3, 4} Mesmo quarenta anos após essa descoberta, as modificações metabólicas e estruturais do organismo provocadas pelo hipoandrogenismo ainda necessitam de mais trabalhos que esclareçam seus efeitos no peso corporal, na capacidade física aeróbica além da massa muscular, bem como no lipidograma e no peso corpóreo.⁸³

O amadurecimento sexual do rato completa-se por volta dos 50 dias após o nascimento e sua fertilidade maior ocorre entre 100 e 300 dias de vida.⁸⁴ Nos estudos sobre glicemia, lipidograma, exercício físico e resistência cicatricial cutânea foram feitas comparações entre animais jovens (30 dias de vida) e adultos (acima de 90 dias), pois alterações endócrinas repercutem na fase inicial da vida de maneira diferente do encontrado em adultos.⁸⁵ Nos demais estudos, foi mais importante o tempo de hipogonadismo do que a idade dos ratos.

Os estudos apresentados neste trabalho foram realizados sucessivamente, dentro de uma linha de pesquisa.^{17 - 34, 86} Em alguns grupos, ocorreram perdas mínimas de dados e não foi necessária reposição de animais, tendo em vista a quantidade satisfatória da amostra obtida e a homogeneidade dos resultados encontrados. A hemólise foi a principal causa de perda das amostras sangüíneas em alguns grupos. A movimentação excessiva dos ratos foi outro fator que impediu a obtenção de dados satisfatórios e em alguns grupos reduziu o número de animais.

No estudo de peso corpóreo e morfologia da glândula adrenal, oito meses após as operações, os animais do Grupo-controle ganharam mais peso que os orquiectomizados. Já no estudo de peso corpóreo e pressão arterial, não houve essa diferença entre os grupos no quinto mês de acompanhamento. No trabalho de Vanderschueren *et al*, a castração não modificou o peso corpóreo.⁸⁷ Snyder *et al* também não encontraram alterações do peso de homens com deficiência androgênica do envelhecimento masculino submetidos a reposição hormonal.⁸⁸ Por outro lado, Smith *et al* verificaram aumento do peso corporal em pacientes com câncer de próstata e que foram castrados.⁴²

A existência de modificações de peso corpóreo influenciadas pelos níveis de testosterona, ainda é um assunto controverso, mas a maioria dos autores verificou que o hipogonadismo reduz a massa muscular, tanto em humanos como em animais.^{11, 89} Se de fato houver a diminuição muscular, é pertinente supor menor desempenho físico. Por esse motivo, foi estudada a possível influência da orquiectomia na resistência física dos ratos em corrida.

Ainda não foi definida a relação entre a perda de massa muscular proveniente do hipogonadismo e a capacidade física.^{69, 70} Os estudos da literatura relacionados com o desempenho físico após hipogonadismo não divergiram dos resultados obtidos neste trabalho, tanto em ratos quanto em homens.^{7, 90} No presente estudo, a orquiectomia mesmo que tenha se acompanhado de hipotrofia muscular, não alterou o desempenho físico aeróbico dos ratos.

Outra função da testosterona é estimular a síntese de proteínas em diferentes tecidos, como músculos esqueléticos, rins e órgãos reprodutores masculinos. Fibroblastos da pele podem converter a testosterona em diidrotestosterona, que pode alterar a síntese de colágeno e de

mucopolissacarídeos. Deve-se destacar que os níveis de testosterona reduzem-se após traumas e estresse cirúrgico e provocam complicações cicatriciais.⁹¹ Embora os hormônios androgênicos não tenham efeito anabólico direto na epiderme, eles podem modular a maturação dos queratinócitos.⁹² Diversos autores verificaram aumento da velocidade de proliferação da epiderme após tratamento com testosterona.^{93 - 96}

O aumento da resistência cicatricial com o passar do tempo era esperado e está de acordo com a literatura. Shamberger *et al* não encontraram influência da testosterona na cicatrização de feridas.⁹¹ É possível que esse hormônio atue apenas nas primeiras etapas da cicatrização de ratos sexualmente imaturos, tendo em vista que a ausência da testosterona tenha se acompanhado de redução da resistência cicatricial. Portanto, a influência desse hormônio no processo cicatricial cutâneo, parece variar com a idade.

O tratamento anti-androgênico pode afetar o metabolismo da glicose, mediado por alterações da composição corporal, especialmente acúmulo de gordura visceral. Smith *et al* encontraram hiperinsulinemia com glicemia normal em homens com câncer de próstata castrados, à semelhança de pacientes diabéticos com aumento da resistência à insulina.^{16, 97} A glicemia dos ratos, neste trabalho, não foi modificada após a castração. No entanto, apenas esse dado é insuficiente para estabelecer uma relação definitiva entre o hipogonadismo masculino e a glicemia. Cabe estudar essa relação por meio de curva glicêmica, hemoglobina glicosada, níveis de insulina sérica ou mesmo utilizar outro modelo animal como Ajayi *et al* que encontraram redução da glicemia de ratos diabéticos castrados.^{98 - 100}

O perfil lipídico sérico padrão consiste na dosagem do colesterol total, triglicérides e colesterol HDL; a partir desses calculam-se VLDL e LDL. Pode-se utilizar o plasma ou o soro. O colesterol no soro é aproximadamente 3% menor que no plasma. O colesterol total e sua fração HDL podem ser medidos em jejum ou após alimentação, pois há diferenças muito pequenas e clinicamente insignificantes nesses valores.¹⁰¹

Dados epidemiológicos documentam a relação entre o nível plasmático de colesterol total e o risco coronariano, especialmente para o sexo masculino abaixo dos 40 anos.^{102, 103} O aumento do colesterol total e da fração LDL são fatores associados ao maior risco de aterosclerose e de doença coronariana, enquanto que aumento do HDL é fator de proteção. Sabe-se que a hipercolesterolemia é importante em mais de 50% dos pacientes com doenças cardiovasculares, mesmo ao considerar outros distúrbios inflamatórios locais co-responsáveis pela aterogênese.^{104 - 106}

O colesterol é o principal substrato para a síntese da testosterona. Segundo Isidori *et al*, há redução do colesterol total após terapia androgênica em homens, sem alteração das frações LDL e HDL.¹¹ Na pesquisa atual, a castração dos ratos não modificou os níveis séricos do colesterol total ou de suas frações LDL e HDL.

Ainda nesta investigação, a orquiectomia em ratos jovens reduziu os níveis sanguíneos de triglicérides e da fração VLDL do colesterol. Tais alterações, talvez sejam indício da influência da testosterona no metabolismo dos lípidos e do colesterol, que ainda precisa ser investigada.^{102, 107} Há evidências do papel da hipertrigliceridemia na aterogênese e, mais recentemente, também da fração VLDL do colesterol.^{108 - 112}

De acordo com a literatura, a redução da testosterona livre pode relacionar-se com alterações na morfologia da glândula adrenal.¹¹³ No entanto, nesta pesquisa, as espessuras das camadas corticais da adrenal não se modificaram após a orquiectomia. Cherry *et al*, em animais com hipogonadismo, e Parker *et al*, em indivíduos falecidos por trauma, também não encontraram diferença na espessura total do córtex dessa glândula após hipogonadismo, mas detectaram redução proporcional da zona reticular em relação às demais zonas corticais.^{113, 114} Considerando que a testosterona é produzida nos testículos e nas adrenais, é necessário esclarecer se a glândula adrenal assume papel compensatório endócrino após orquiectomia.

O método invasivo da medida de pressão arterial do rato requer infusão contínua de anticoagulante para manter o fluxo sanguíneo. A dor causada pela punção arterial pode afetar a frequência cardíaca e a pressão arterial. Para evitar esses inconvenientes, optou-se por um método não-invasivo. Além disso, a acurácia de medidas não-invasivas da pressão arterial não diferem dos métodos invasivos em ratos de pressão normal, desde que haja treinamento do examinador e adestramento do animal, mesmo considerando que os métodos invasivos possam ser melhores. Ambiente tranquilo, aclimatação adequada e manipulação gentil do rato diminuem os fatores intervenientes e tornam as mensurações fidedignas.⁸⁰

A revisão da literatura indica que a administração de testosterona exacerba a pressão arterial de ratos previamente hipertensos e que a castração desses animais reduz a pressão arterial.^{12, 14, 15, 94, 98, 115} No entanto, não foi documentado o mesmo efeito em ratos de pressão arterial normal. Neste trabalho, a castração acompanhou-se de aumento da pressão arterial, resultado

semelhante ao encontrado por Calhoun *et al.*¹¹⁷ Cabe investigar os mecanismos envolvidos nessa reação adversa e compreendê-los em sua real dimensão.

Os radiofármacos com $^{99}\text{Tc}^m$ tornaram-se importantes na propedêutica médica das últimas décadas, devido à sua praticidade de execução e ao baixo índice de reações adversas, quando comparado a outros contrastes.^{118, 119} A avaliação da função do SMF mediante a captação de enxofre coloidal marcado com tecnécio vem sendo estudada em linha de pesquisa desde a década de 1990.^{18, 20 – 22, 24 – 27, 29, 33, 34, 86} Os valores muito reduzidos de colóide radioativo, encontrados no coágulo sangüíneo, indicam que o SMF dos ratos desempenhou adequadamente o seu papel de defesa, ao remover partículas anômalas da circulação.^{18, 21, 22} A captação do colóide pelos principais órgãos do SMF, fígado, baço e pulmão, não foi alterada pelo hipogonadismo e parece que já funciona no rato com mais de 30 dias de vida. Os resultados obtidos não detectaram modificação do sistema mononuclear fagocitário, diferentemente dos resultados da literatura.^{120, 121}

As repercussões do hipoandrogenismo não são meramente o inverso dos efeitos esperados em relação aos níveis normais dos hormônios testiculares, conforme pôde ser verificado neste trabalho. As conseqüências da castração ocorrem em órgãos e sistemas que podem ser dependentes entre si, dificultando a distinção entre os fatores causais e os intervenientes. Há indícios de que o peso e a capacidade física estejam relacionados entre si. Com base em nossos resultados, ainda não se pode afirmar que o peso e a capacidade física se correlacionam em decorrência da estrutura muscular. Em estudos futuros deverá ser verificada a relação do hipogonadismo com a massa muscular corpórea.

As indicações de orquiectomia já são bem estabelecidas, entretanto é preciso conhecer e prevenir as complicações inerentes a esse tratamento. Novas pesquisas devem prosseguir para preencher lacunas quanto aos efeitos do hipogonadismo masculino. A ausência congênita de testículos é uma condição rara e os efeitos indesejáveis do hipogonadismo, especialmente em relação ao risco cardiovascular, ocorrem mais nos pacientes idosos, grupo esse no qual a orquiectomia é indicada mais freqüentemente.^{122, 123} Nesse sentido, cabe ressaltar que o hipogonadismo não decorre apenas da orquiectomia, mas pode fazer parte da evolução natural em pessoas de idade avançada, além de ser uma das complicações possíveis de ocorrer após orquites graves.

9 CONCLUSÕES

A orquiepididimectomia total bilateral reduz os níveis séricos de testosterona no rato, independentemente da idade do animal.

Não ocorrem alterações morfológicas aparentes da glândula adrenal, tanto macroscópicas quanto microscópicas.

O hipogonadismo secundário a orquiepididimectomia total bilateral não altera valores séricos de glicose, colesterol total e das frações LDL e HDL. Entretanto, a castração de ratos jovens reduz os níveis sanguíneos de triglicérides e de colesterol VLDL.

A redução da resistência cicatricial cutânea nas primeiras etapas da cicatrização de ratos sexualmente imaturos castrados são indícios da influência da testosterona no processo cicatricial cutâneo e que parece variar com a idade do animal e com a fase de cicatrização.

A deficiência de testosterona relaciona-se com:

- menor ganho ponderal tardio,
- aumento da pressão arterial.

Não foi encontrada influência da orquiectomia:

- na capacidade física do rato,
- na função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário.

10 REFERÊNCIAS

1. Carvalho JAM, Garcia RA. O envelhecimento da população brasileira. *Cad Saúde Pública* 2003; 19: 725-33.
2. Freeman ER, Bloom DA, McGuire EJ. A brief history of testosterone. *J Urol* 2001; 165: 371-3.
3. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate - 1941. *J Urol* 2002; 168: 9-12.
4. Nobel Web AB. Nobel-prize.org [homepage na Internet]. Stockholm: Nobel Foundation [atualizada em 2007, acesso 2007 Jan 2]. Disponível em: <http://www.nobelprize.org>
5. Lopes EJA. Análise da deficiência androgênica e terapia de reposição em homens idosos. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 2004.
6. Simão OP. Efeitos da orquiepididimectomia total e da orquiectomia subcapsular sobre os níveis plasmáticos de testosterona em ratos. 69f. Dissertação (Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.
7. Isayama RN. Efeitos da testosterona em músculos esqueléticos de ratos jovens e senis. 32 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
8. Bagatell CJ, Bremner WJ. Androgen and progestagen effects on plasma lipids. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 255-71.

9. Eckardstein A, Wu FC. Testosterone and atherosclerosis. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13: S72-84.
10. Grainger DJ, Witchell CM, Metcalfe JC. Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med* 1995; 1: 1067-73.
11. Isidori AM, Giannetta E, Greco EA, Gianfrilli D, Bonifácio V, Isidori A, Lenzi A, Fabbri A. Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men. *Clin Endocrinol* 2005; 63: 280–93.
12. Martin DS, Biloft S, Redetzke R, Vogel E. Castration reduces blood pressure and autonomic venous tone in male spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005; 23: 2229-36.
13. Morrison JA, Barton BA, Biro FM, Sprecher DL. Sex hormones and the changes in adolescent male lipids. *J Pediatr* 2003; 142: 637-42.
14. Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001; 37: 1199–1208.
15. Reckelhoff JF. Sex steroids, cardiovascular disease and hypertension. *Hypertension* 2005; 45: 170-4.
16. Yannucci J, Manola J, Garnick MB, Bhat G, Bublely GJ. The effect of androgen deprivation therapy on fasting serum lipid and glucose parameters. *J Urol* 2006; 176: 520-5.
17. Alberti LR, Caldeira DAM, Rocha RF, Petroianu A. Influência do ritmo circadiano na resistência física de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2005; 50: 27-32.

18. Almeida LM, Melo MAB, Simal CJR, Petroianu A. Efeito da heparina sobre o sistema mononuclear fagocitário. *Acta Cir Bras* 1996; 11: 15-6.
19. Arantes VN, Okawa RY, Fagundes-Pereyra WJ, Barbosa AJA, Petroianu A. Influência da icterícia obstrutiva na cicatrização da pele e de anastomose jejunal em ratos. *Rev Col Bras Cir* 1999; 26: 269-73.
20. Araujo ID, Petroianu A, Simal CJR. 99M TC sulfur colloid uptake by rat liver spleen and lungs in early biliary obstruction. *Med Sci Res* 1996; 24: 245-6.
21. Marques RG, Petroianu A, Oliveira MBN, Bernardo-Filho M. Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. *Acta Cir Bras* 2002; 17:388-93.
22. Marques RG, Petroianu A, Oliveria MBN, Bernardo-Filho M, Portela MC. Evaluation of possible failure of the mononuclear phagocyte system after total splenectomy in rats. *Braz Arch Biol Technol* 2004; 47: 199-204.
23. Petroianu A, Alberti LR, Vasconcellos LS. Allogeneic ovarian orthotopic transplantation in rabbits without a vascular pedicle. *Transplant Proc* 2006; 38: 3092-3.
24. Petroianu A, Barbosa AJA. Quantitative studies on the macrophage phagocytosis in whole spleen and in the remnant of subtotal splenectomy. *Med Sci Res* 1991; 19: 373-5.
25. Petroianu A, Simal CJR, Barbosa AJA. Assessment of phagocytic function in remnants of subtotal splenectomy and autologous spleen implantation. *Med Sci Res* 1993; 21: 715-7.

26. Petroianu A, Simal CJR, Barbosa AJA. Impairment of phagocytosis by mammalian splenic macrophages by ^{99m}Tc sulphur colloid. *Med Sci Res* 1992; 20: 874-9.
27. Petroianu A, Simal CJR, Barbosa AJA. Splenic macrophage phagocytic function after subtotal splenectomy in the dog. *Med Sci Res* 1992; 20: 127-8.
28. Petroianu A, Vasconcellos LS, Leite JM, Sabino KR. Influência da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004; 48: 299-304.
29. Petroianu A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto-implante esplênico autógeno. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25: 25-30.
30. Rodrigues FHOC, Carneiro BGMC, Costa GR, Veloso DFM, Figueiredo JA, Petroianu A. Resistência cicatricial de segmentos cranial e caudal da região dorsal de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2004; 49: 110-4.
31. Rodrigues FHOC, Carneiro BGMC, Costa GR, Veloso DFM, Figueiredo JA, Nunes CB, Petroianu A. Efeito da orquiectomia na resistência cicatricial cutânea em ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 2003; 48: 90-3.
32. Salgado MI, Petroianu A, Burgarelli GL, Barbosa AJA, Alberti LR. Cicatrização conduzida e enxerto de pele parcial no tratamento de feridas. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53: 80-4.
33. Vasconcellos LS, Sabino KR, Petroianu A, Simal CJR. Atividade fagocitária do sistema mononuclear fagocitário na gravidez. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25: 213-8.

34. Vasconcellos LS, Sabino KR, Petroianu A. Influência da ooforectomia e da gravidez na função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário em modelo experimental. *J Bras Patol Méd Lab* 2005; 41: 153-8.
35. Basaria S, Dobs AS. Hypogonadism and androgen replacement in elderly men. *Am J Med* 2001; 110: 563-72.
36. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Syder PJ, Swerdloff RS, Montori VM. Testosterone therapy in adult men in androgen deficiency syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 91: 1995-2010.
37. Dobs AS, Melke AW, Arver S, Sanders SW, Caramelli KE, Mazer NA. Pharmacokinetics, efficacy and safety of a permeation-enhanced testosterone transdermal system in comparison with biweekly injections of testosterone enanthate of hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3469-78.
38. Hajjar RR, Kaiser FE, Marley JE. Outcomes of long term testosterone replacement in older hypogonadal males. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3793-6.
39. Sih R, Morley JE, Kaiser FE, Perry HM, Patrick P, Ross C. Testosterone replacement in older hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1661-7.
40. Snyder PJ, Peachey H, Berlin JA, Hannoush P, Haddad G, Dlewati A, et al. Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2670-7.
41. Wang C, Swerdloff RS, Iranmanesh A, Dobs A, Snyder PJ, Cunningham G, Matsumoto AM, Weber T, Berman N. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition

- parameters in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2839-53.
42. Smith MR, Finkelstein JS, McGovern FJ, Zietman AL, Fallon MA, Schoenfeld DA, Kantoff PW. Change in body composition during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 599-603.
43. Casquero AC. Efeitos de hormônios sexuais masculinos sobre o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas e expressão da CETP em camundongos geneticamente modificados sedentários e exercitados. 99 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas; 2005.
44. Srinivasan GS, Sundaram GS, Williamson GD, Webber LS, Berenson GS. Serum lipoproteins and endogenous sex hormones in early life. *Metabolism* 1985; 34: 861-7.
45. Santen RJ. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest* 1975; 56: 1555-63.
46. Alexandersen P, Christiansen C. The aging male. *Atherosclerosis* 2004; 173: 157-69.
47. Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84: 813-9.
48. Ozata M, Yildirimkaya M, Bulur M, Yilmaz K, Bolu E, Corakci A, Gundogan MA. Effects of gonadotropin and testosterone treatments on lipoprotein(a), high density lipoprotein particles, and other lipoprotein levels in male hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3372-8.

49. Tan KCB, Shiu SWM, Pang RWC, Kung AWC. Effects of testosterone replacement on HDL subfractions and apolipoprotein A-I containing lipoproteins. *Clin Endocrinol* 1998; 48: 187-94.
50. Eckardstein A, Kliesch S, Nieschlag E, Chirazi A, Assmann G, Behre HM. Suppression of endogenous testosterone in young men increases serum levels of high density lipoprotein subclass lipoprotein A-I and lipoprotein. *J Clin Endocr Metab* 1997; 82: 3367-72.
51. Greger NG, Insull W Jr, Probstfield JL, Keenan BS. High-density lipoprotein response to 5- α -dihydrotestosterone and testosterone in *Macaca fascicularis*. *Metabolism* 1990; 39: 919-24.
52. Reckless J, Metcalfe JC, Grainger DJ. Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 1997; 95: 1542-8.
53. Ashcroft GS, Mills SJ. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest* 2002; 110: 615-24.
54. Gilliver SC, Ashworth JJ, Ashcroft GS. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 56-62.
55. Gilliver SC, Ashworth JJ, Mills SJ, Hardman MJ, Ashcroft GS. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *J Cell Sci* 2006; 119: 722-32.
56. Dyson M, Joseph J. The effect of androgens on tissue regeneration. *J Anat* 1968; 103: 491-505.
57. Daniell HW, Dunn SR, Ferguson DW, Lomas G, Niazi Z, Stratte PT. Progressive osteoporosis during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 181-6.

58. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP. Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34: 920-3.
59. Ross RW, Small EJ. Osteoporosis in men treated with androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol* 2002; 167: 1952-6.
60. Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 1996; 94: 2614-9.
61. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 1720-7.
62. Ding AQ, Stallone JN. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol* 2001; 91: 2742-50.
63. Honda H, Unemoto T, Kogo H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34: 1232-6.
64. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. The vasodilatory action of testosterone. *Br J Pharmacol* 2003; 38: 733-44.
65. Murphy JG, Khalil RA. Decreased [Ca²⁺]_i during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17beta-estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 44-52.

66. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 735-40.
67. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995; 91: 1154-60.
68. Bardin CW. The anabolic action of testosterone. *New Engl J Med* 1996; 335: 52-3.
69. Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol* 2001; 170: 27-38.
70. Herbst KL, Bhasin S. Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 271-7.
71. Sinha -Hikin I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hipertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: 154-64.
72. Azevedo RB. Efeitos da castração sobre aspectos morfofuncionais e metabólicos de macrófagos e linfócitos de ratos machos e fêmeas. 97 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
73. Smith LK, Forgie ML, Pellis SM. The postpubertal change in the playful defense of male rats depends upon neonatal exposure to gonadal hormones. *Physiol Behav* 1997; 63: 151-5.
74. Braude S, Tang-Martinez Z, Taylor GT. Stress, testosterone, and the immunoredistribution hypothesis. *Behav Ecol* 1999; 10:345-50.

75. Petroianu A: "Pesquisa experimental". In Petroianu A – Ética, Moral e Deontologia Médicas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000, p.185-90.
76. Rollin BE. The regulation of animal research and the emergence of animal ethics. *Theor Med Bioeth* 2006; 27: 285-304.
77. Rocha DC, Debeljuk L, Franca LR. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue Cell* 1999; 31: 372-9.
78. Flecknell PA. Anaesthesia of animals for biomedical research. *Br J Anaesth* 1993; 71: 885-94.
79. Gonzalez B, Hernando R, Manso R. Anabolic steroid and gender-dependent modulation of cytosolic HSP70s in fast- and slow-twitch skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74: 63–71.
80. Whitesall SE, Hoff JB, Vollmer AP, D'Alecy LG. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286: 2408-15.
81. Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1756-8.
82. Hung JC, Ponto JA, Hammes RJ. Radiopharmaceutical-related pitfalls and artifacts. *Semin Nucl Med* 1996; 26: 208-55.
83. Bhasin S, Herbst K. Testosterone and atherosclerosis progression in men. *Diabetes Care* 2003; 26: 1929-31.

84. Lee VM, de Krester DM, Hudson B, Wang C. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J Reprod Fertil* 1975; 42: 121-6.
85. Tapanainen J, Kuopio T, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol Reprod* 1984; 31: 1027-35.
86. Sousa VRA, Sousa AA, Petroianu A, Simal CJR, Barbosa AJA. Influence of acute renal failure on the mononuclear phagocytic system. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34:1169-74.
87. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R. An aged rat model of partial androgen deficiency. *Endocrinology* 2000; 141: 1642-7.
88. Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, Berlim JA, Loh L, Lenlow DA, Holmes JH, Dlewatti A, Santana J, Rosen CJ, Strom BL. Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2647-53.
89. Anukulitch C, Rao A, Dunshea FR, Blache D, Lincoln GA, Clarke IJ. Influence of photoperiod and gonadal status on food intake, adiposity, and gene expression of hypothalamic appetite regulators in a seasonal mammal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R242–52.
90. Arlt W, Callies F, Koehler I, Vligmen JCV, Fassnacht M, Strasburger CJ, Seibel MB, Huebler D, Ernst M, Oettel M, Reincke M, Schulte HM, Alloio B. Dehydroepiandrosterone supplementation in healthy men with and age-related decline of dehydroepiandrosterone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4686-92.

91. Shamberger RC, Thistlethwaite PA, Thibault LE, Brennan MF. The effect of testosterone propionate on wound healing in normal and castrate rats. *J Surg Res* 1982; 33: 58-68.
92. Tammi R, Santti R. Morphometric analysis of human epidermis treated with testosterone and dehydroepiandrosterone in organ culture. *Arch Dermatol Res* 1989; 281: 417-23.
93. Eartly H, Grad B, Leblond C.P. The antagonistic relationship between testosterone and thyroxine in maintaining the epidermis of male rat. *Endocrinology* 1951; 49: 677-86.
94. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 513-56.
95. Mukai M, Dong Q, Hardy MP, Kiyokawa H, Peterson RP, Cooke PS. Altered prostatic epithelial proliferation and apoptosis, prostatic development, and serum testosterone in mice lacking cyclin-dependent kinase inhibitors. *Biology Reproduction* 2005; 73: 951-8.
96. Zackheim HS. Effect of prolonged administration of testosterone on the epidermis of female rats. *J Invest Dermatol* 1968; 50: 401-4.
97. Smith JC, Bennett S, Evans LM, Kynaston HG, Parmar M, Mason MD, Cockcroft JR, Scanlon MF, Davies JS. The effects of induced hypogonadism on arterial stiffness, body composition and metabolic parameters on males with prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4261-7.
98. Ajayi AA, Ogungbade GO, Okorodudu AO. Sex hormone regulation of systemic endothelial and renal microvascular reactivity in type-2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 349-57.

99. Livingstone C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci* 2002; 102: 151–66.
100. Svartberg J, Jenssen T, Sundsfjord J, Jorde R. The associations of endogenous testosterone and sex hormone-binding globulin with glycosylated hemoglobin levels, in community dwelling men. *Diabetes Metab* 2004; 30: 29-34.
101. Craig SR, Amin RV, Russell DW, Paradise NF. Blood cholesterol screening influence of fasting state on cholesterol results and management decisions. *J Gen Intern Med* 2000; 15: 395-9.
102. Hak AE, Witteman JCM, de Jong FH, Geerlings MI, Hofman A, Pols HAP. Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3632–9.
103. Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA* 2000; 284: 311-8.
104. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary artery disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-14.
105. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-1890.
106. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 14; 340: 115-26.
107. Weidemann W, Hanke H. Cardiovascular effects of androgens. *Cardiovasc Drug Rev* 2002; 20: 175–98.

108. Ballantyne CM, Grundy SM, Oberman A, Kreisberg RA, Havel RJ, Frost PH, Haffner SM. Hyperlipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2089-112.
109. De Man FH, Cabezas MC, Van Barlingen HH, Erkelens DW, de Bruin TW. Triglyceride-rich lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 89 –108.
110. Guérin M, Goff W, Lassel TS, Tol AV, Steiner G, Chapman MJ. Proatherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL1 and dense LDL in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 282-8.
111. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: A meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 213.
112. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3542–56.
113. Parker CR Jr, Mixon RL, Brissie RM, Grizzle WE. Aging alters zonation in the adrenal cortex of men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3898-901.
114. Cherry BA, Cadigan B, Mansourian N, Nelson C, Bradley EL. Adrenal gland differences associated with puberty and reproductive inhibition in *Peromyscus maniculatus*. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 104–13.
115. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 435-439.

116. Sáinz J, Osuna A, Wangensteen R, Luna JD, Rodríguez-Gómez I, Duarte J, Moreno JM, Vargas F. Role of sex, gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced hypertension. *Exp Physiol* 2004; 89: 155-62.
117. Calhoun DA, Zhu ST, Chen YF, Oparil S. Gender and dietary NaCl in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 1995; 26: 285-9.
118. Hesslewood SR, Keeling DH. Frequency of adverse reactions to radiopharmaceuticals in Europe. *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 1179–82.
119. Marques FLN, Okamoto MRY, Buchpiguel CA. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiol Bras* 2001; 34:233–9.
120. Ferrandez MD, de la Fuente M, Fernandez E, Manso R. Anabolic steroids and lymphocyte function in sedentary and exercise-trained rats. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 59: 225-32.
121. Yao G, Liang J, Han X, Hou Y. In vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen. *Int Immunopharmacol* 2003; 1853–60.
122. Dockery F, Bulpitt CJ, Agarwal S, Donaldson M, Rajkumar C. Testosterone suppression in men with prostate cancer leads to an increase in arterial stiffness and hyperinsulinaemia. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104: 195-201.
123. Favorito LA, Klojda CA, Sampaio FJ. Congenital absence of the testis in human fetuses and in cryptorchid patients. *Int J Urol* 2004; 11: 1110-3.